

# Mangel på PLIN2 i myotuber fra mus gir redusert evne til lagring av lipider og økt lipidoksidasjon

*Økt lipidmetabolisme fører til redusert evne  
til å ta opp og oksidere glukose i  
skjelettmuskel*

Masteroppgave for graden Master i farmasi



**Irlin Knivsland Knabenes**

Avdeling for farmasøytisk biovitenskap  
Farmasøytisk institutt  
Det matematisk-naturvitenskaplige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Mai 2013



# Mangel på PLIN2 i myotuber fra mus gir redusert evne til lagring av lipider og økt lipidoksidasjon

*Økt lipidmetabolisme fører til redusert evne  
til å ta opp og oksidere glukose i  
skjelettmuskel*

Masteroppgave for graden Master i farmasi

**Irlin Knivslund Knabenes**



Avdeling for farmasøytisk biovitenskap  
Farmasøytisk institutt  
Det matematisk-naturvitenskaplige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Veiledere

Professor Arild C. Rustan  
Professor G. Hege Thoresen  
Førsteamanuensis Knut Tomas Dalen

© Irlin Knivslund Knabenes

2013

Mangel på PLIN2 i myotuber fra mus gir redusert evne til lagring av lipider og økt lipidoksidasjon

Irlin Knivslund Knabenes

<http://www.duo.uio.no/>

Trykk: Reprosentralen, Universitetet i Oslo

# Forord

Denne masteroppgaven ble utført ved Avdeling for farmasøytisk biovitenskap, Farmasøytisk institutt, i samarbeid med Avdeling for ernæringsforskning, Universitetet i Oslo i perioden august 2012 til mai 2013.

Jeg vil gjerne takke mine veiledere professor Arild C. Rustan, professor G. Hege Thoresen og førsteamanuensis Knut Tomas Dalen for god veiledning, hjelp og nyttige tilbakemeldinger. Jeg vil rette en særlig stor takk til min veileder Arild C. Rustan, for hans engasjement, støtte og gode oppfølging gjennom hele året som har gått. Det hadde ikke vært det samme uten deg! Takk til Eili T. Kase for opplæring i qPCR metoden og hjelp underveis, samt til Siril S. Bakke for hjelp til å ta flotte bilder med live cell imaging og for gode svar på de mange spørsmål jeg har stilt. Takk til Camilla og de andre ingeniørene i 4. etasje for god opplæring i celledyrking samt assistanse når uforutsette problemer har dukket opp på laben. Takk til mine medstudenter på kontoret for mye latter, delte sorger og vilje til å hjelpe med store og små problemer.

Det har vært et flott år i et hyggelig arbeidsmiljø som jeg kommer til å savne.

Sist men ikke minst takk til min gode venninne Ida Marie Thrane, for litt for lange luncher på fysikken, et godt vennskap og støtte og motivasjon gjennom hele studiet. Vi klarte det!

Oslo, mai 2013

Irlin Knivsland Knabenes

# Abstract

*Introduction:* Type 2 diabetes (T2D) and the metabolic syndrome are diseases in rapid growth in the world's population, and are related to obesity and insulin resistance. Increased storage of lipids in skeletal muscle (intramyocellular lipids, IMCL) is positively associated with insulin resistance, but recent evidence suggests that lipid intermediates like acyl-CoA, diacylglycerol (DAG) and ceramides are the mediators that cause insulin resistance. Increased IMCL has been found in highly trained endurance athletes who are not insulin resistant. This athletes-paradox has led to theories that packing of lipids in IMCL can protect the cells from adverse effects of lipid intermediates. After cellular uptake free fatty acids (FFA) will either be used for energy production mainly in mitochondria, or they will be stored as triacylglycerol (TAG) in lipid droplets (LD). LD in the cells cytoplasm consists of a lipophilic core of neutral lipids, mainly TAG, surrounded by a phospholipid monolayer and lipid droplet associated proteins. The lipid droplet associated proteins (perilipins, PLINs) help regulate the LD, and in skeletal muscle the protein PLIN2 is the most abundant. It is still unknown what role PLIN2 plays in regulation of energy metabolism in skeletal muscle cells. One theory is that PLIN2 inhibits lipolysis of TAG by reducing the contact between lipases and the lipid droplet. It has been shown that PLIN2 is important for the storing of FFA in lipid droplets, and an increased amount of PLIN2 has been associated with increased insulin sensitivity.

*Methods:* Satellite cells from *PLIN2-WT* and *PLIN2-KO* mice were isolated, proliferated and differentiated over 4 days to myotubes. Substrate oxidation assays were carried out with *PLIN2-WT* and *PLIN2-KO* myotubes over 4 h with  $^{14}\text{C}$ -oleic acid (OA) or  $^{14}\text{C}$ -glucose, as well as pretreatment with  $^{14}\text{C}$ -labeled OA for 24 h or the PPAR $\delta$  agonist GW501516 (for 2 days). Acute treatments with a mitochondrial uncoupler (FCCP), OA or glucose, were also performed to study differences in the effects of these substances on energymetabolism in *PLIN2-WT* and *PLIN2-KO* myotubes. Accumulation of OA over 24 h as well as subsequent lipolysis of OA over 6 h was measured using scintillation proximity assay (SPA). Storing in lipid droplets (LD) was measured using live cell imaging after 24 h pre-treatment with OA. The amount of acid soluble metabolites (ASM) in the medium after treatment with  $^{14}\text{C}$ -OA was also determined, as well as the amount of neutral lipids (lipidfiltration) accumulated in the myotubes. The expression of some genes important for cellular energy metabolism were also measured using qPCR.

*Results:* Oxidation of oleic acid was increased in *PLIN2-KO* myotubes compared to *PLIN2-WT* myotubes. Both complete OA oxidation to CO<sub>2</sub> and incomplete oxidation ( $\beta$ -oxidation) to acid-soluble metabolites (ASM) were increased. Less FFA was stored in lipid droplets after 24 h pretreatment with OA in *PLIN2-KO* myotubes, which had fewer lipid droplets per nucleus compared to *PLIN2-WT* myotubes. Over time less OA accumulated in *PLIN2-KO* myotubes than *PLIN2-WT* cells, and after 24 h the amount of OA in KO cells was significantly lower. Lipid content of neutral lipids in *PLIN2-KO* myotubes was markedly lower compared to *PLIN2-WT* cells after long-term incubation with OA. No difference was found between the donor groups with regards to lipolysis of fatty acids, when this parameter was related to the amount of OA that was present in the cells at the start of lipolysis measurements. Both oxidation and uptake of glucose was reduced in *PLIN2-KO* myotubes. The oxidation and uptake of OA increased when PPAR $\delta$  was activated by the agonist GW501516, and mitochondrial uncoupling by treatment with FCCP showed that *PLIN2-KO* myotubes had a higher maximum oxidative capacity than *PLIN2-WT* myotubes. The gene expression of DGAT2, CPT1b, CYC1 and PGC1 $\alpha$  was reduced in *PLIN2-KO* myotubes.

*Discussion/conclusion:* The results indicate that a lack of the PLIN2 protein leads to a reduced ability to store FFA in myotubes as TAG in LD. The differences were most clear after incubation with OA over a longer period of time (24 h). FFA that cannot be stored in the *PLIN2-KO* myotubes instead go towards oxidation in the mitochondria, and the oxidation of OA was increased in *PLIN2-KO* myotubes compared with *PLIN2-WT* cells. The increased oxidation of OA promoted a decreased glucose metabolism in the cells, and the uptake, accumulation and oxidation of glucose was reduced in *PLIN2-KO* myotubes. The expression of genes important for lipid uptake, mitochondrial function/oxidation and TAG synthesis was influenced by the lack of PLIN2 protein.

# Sammendrag

*Innledning:* Type 2 diabetes (T2D) og metabolsk syndrom er sykdommer som er i kraftig vekst i befolkningen, og som er relatert til fedme og insulinresistens. Økt mengde lipider i skjelettmuskel som IMCL er assosiert med økt insulinresistens, men mye tyder på at det er lipidintermediater som acyl-CoA, diacylglycerol (DAG) og ceramider som påvirker insulinsensitiviteten mest. Det er vist økt IMCL i godt trente utholdenhetsutøvere som ikke er insulinresistente. Dette paradokset har ført til teorier om at pakking av lipider i IMCL faktisk kan beskytte cellen. Frie fettsyrer (FFA) som tas opp i cellen går enten til energiproduksjon ved oksidasjon i mitokondriene, eller lagres som triglyserider (TAG) i lipiddråper (LD). LD befinner seg i cellens cytosol, og består av en lipofil kjerne av nøytrale lipider (hovedsakelig TAG), omkranset av fosfolipider og lipiddråpeassosierte proteiner. De lipiddråpeassosierte proteinene (perilipiner, PLINs) er med på å regulere lipiddråpene, og i skjelettmuskel er PLIN2 proteinet det som er høyest uttrykt. Det er enda uklart hvilken rolle PLIN2 spiller i regulering av energimetabolismen i skjelettmuskel. En teori går på at PLIN2 hemmer lipolyse av TAG ved å hindre kontakt mellom lipaser og LD. Det er vist at PLIN2 er viktig for lagring av FFA i lipiddråper, og økt mengde PLIN2 har blitt assosiert med økt insulinsensitivitet.

*Metode:* Satelittceller fra *PLIN2-WT* og *PLIN2-KO* mus ble dyrket og differensiert til myotuber over 4 dager. Det ble utført substratoksidasjonsforsøk over 4 timer ved tilsetning av  $^{14}\text{C}$ -oljesyre (OA) eller  $^{14}\text{C}$ -glukose, samt forbehandling med  $^{14}\text{C}$ -OA over 24 timer eller PPAR $\delta$  agonisten GW501516 over 2 dager og akuttbehandling med mitokondriell frikobler (FCCP), OA eller glukose, for å undersøke forskjeller i effekten av disse mellom *PLIN2-WT* og *PLIN2-KO* myotuber. Akkumulering av OA over 24 timer samt lipolyse av OA over 6 timer ble målt med «scintillation proximity assay» (SPA). Lagring i LD ble undersøkt ved live cell imaging etter 24 timers forbehandling med OA. Mengde syreløselige metabolitter (ASM) i mediet etter behandling med OA ble også målt. Det ble gjennomført bestemmelse av totallipid (lipidfiltrering) på myotubene etter SPA forsøk, for å undersøke akkumulert mengde nøytrale lipider. mRNA uttrykk ved qPCR ble utført for å undersøke uttrykk av PLIN2 og noen gener som er viktige for energimetabolismen.

*Resultater:* Det ble funnet økt oljesyreoksidasjon i *PLIN2-KO* myotuber sammenlignet med *PLIN2-WT* myotuber, da både fullstendig oksidasjon til  $\text{CO}_2$  og ufullstendig oksidasjon ( $\beta$ -oksidasjon) til syreløselige metabolitter (ASM) var økt. Lagring av FFA i LD etter 24 timers



forbehandling var redusert i *PLIN2-KO* myotuber, som hadde færre LD per kjerne sammenlignet med *PLIN2-WT* myotuber. OA ble over tid akkumulert i cellene i lavere grad i *PLIN2-KO* myotuber, med signifikant forskjell mellom donorgruppene ved 24-timerspunktet. Også lipidmåling viste redusert mengde nøytrale lipider i *PLIN2-KO* myotuber sammenlignet med *PLIN2-WT* myotuber etter langtidsakkumulering. Det ble ikke funnet noen forskjeller i lipolyse mellom donorgruppene når denne ble relatert til mengde OA som var akkumulert i cellene ved start av lipolyseforsøkene. Både oksidasjon og opptak av glukose var lavere i *PLIN2-KO* myotuber enn i *PLIN2-WT* myotuber. Oksidasjonen og opptaket av OA økte ved aktivering av PPAR $\delta$  ved forbehandling av cellene med GW501516, og tilsetning av FCCP akutt viste at *PLIN2-KO* myotuber hadde en høyere maksimal oksidativ kapasitet enn *PLIN2-WT* myotuber. Genekspresjonsstudier viste tydelig redusert mRNA-uttrykk av DGAT2, CPT1b, CYC1 og PGC1 $\alpha$  i *PLIN2-KO* myotuber.

*Diskusjon/konklusjon:* Resultatene indikerer at mangel på PLIN2 proteinet i myotuber fører til redusert evne til å lagre FFA i myotubene som TAG i LD. Forskjellene var tydeligst etter lengre tids inkubering med OA. FFA som ikke blir lagret i *PLIN2-KO* myotubene går til oksidasjon i mitokondriene, og oksidasjonen var økt i *PLIN2-KO* myotuber sammenlignet med *PLIN2-WT* myotuber. Den økte oksidasjonen av OA går på bekostning av glukosemetabolismen, og det var lavere opptak, akkumulering og oksidasjon av glukose i *PLIN2-KO* myotuber sammenlignet med *PLIN2-WT* myotuber. Mangel på PLIN2 påvirket også mRNA-uttrykket av flere gener som spiller en rolle i blant annet lipidopptak, mitokondriell funksjon/oksidasjon av OA, samt syntese av TAG.

# Forkortelser

ACAT	Acyl-CoA kolesterol acyltransferase
ACBP	Acyl-CoA-bindende protein
ACC	Acetyl-CoA karboksylase
ACOT1	Acyl-CoA thioesterase 1
ADP	Adenosindifosfat
ADRP	Adipose differensierings-relatert protein
AKT	Protein kinase B
Angptl4	Angiopoietin-relatert protein 4
ASM	Acid soluble metabolites (syreløselige metabolitter)
ATGL	Fettvevstriglyceridlipase
ATP	Adenosintrifosfat
BSA	Bovint serum albumin
CA	Celleassosiert
cAMP	Syklisk-adenosin-monofosfat
CAT	Karnitintranslokase
cDNA	Komplementært DNA
CoA	Koenzym A
CPT1/CPT2	Karnitin-palmitoyltransferase 1, 2
CRP	C-reaktiv protein
CYC1	Cytokrom C-1
DAG	Diacylglycerol
DGAT 1, 2	Diacylglycerol acyltransferase 1, 2
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO	Dimetylsulfoksid
DNA	Deoksyribonukleinsyre
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
ER	Endoplasmatisk retikulum
ETC	Elektrontransportkjeden
FABP <sub>c</sub>	Fettsyrebindende protein-cytoplasma
FABP <sub>pm</sub>	Fettsyrebindende protein-plasmamembran
FADH <sub>2</sub>	Flavin-adenin-dinukleotid
FAT/CD36	Fettsyretranslokase/"cluster of differentiation 36"
FATP1	Fettsyretransport protein 1
FBS	Føtal bovint serum
FCCP	Karbylcyanid p-trifluorometoksyfenylhyrazon
FFA	Frie fettsyrer
GLUT4	Glukosetransportør 4
HBSS	Hanks Balanced Salt Solution
HSL	Hormonsensitiv lipase
HDL	High-density lipoprotein
IDF	International diabetes federation
IL-6	Interleukin-6
IMCL	Intramyocellulære lipider
IRS	Insulinreseptorsubstrat
I $\kappa$ K $\beta$	Inhibitorisk $\kappa$ kinase $\beta$
JNK	c-Jun <i>N</i> -terminal kinase
KD	Knockdown
KMI	Kroppsmasseindeks

KO	Knockout/utslått
LD	Lipiddråpe
MAG	Monoacylglyserol
mRNA	Messenger ribonukleinsyrer
NADH	Nikotinamid-adenin-dinukleotid
OA	Oljesyre
OXPHOS	Oksidativ fosforylering
PAT	<u>P</u> erilipin, <u>A</u> dipofilin og <u>T</u> IP-47 relaterte proteiner
PDE3B	Fosfodiesterase 3B
PDH	Pyruvatdehydrogenase
PDK	Pyruvatdehydrogenase-komplekset
PDK4	Pyruvatdehydrogenase kinase-isozym 4
PFK-1	Fosfofruktokinase 1
PGC1 $\alpha$	Peroxisom proliferator aktivert reseptor gamma koaktivator 1 alfa
PGC1 $\beta$	Peroxisom proliferator aktivert reseptor gamma koaktivator 1 beta
PI3K	Fosfatidylinositol 3-kinase
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PP2A	Proteinfosfatase 2A
PPAR	Peroksisomproliferator-aktivert reseptor
qPCR	Kvantitativ polymerasekjedereaksjon
RNA	Ribonukleinsyre
RNS	Reaktive nitrogenspesier
ROS	Reaktive oksygenspesier
Rpm	Rotasjoner per minutt

RXR	Retinoid-X-reseptor
SEM	Standardfeil
SPA	«Scintillation proximity assay»
T2D	Type 2 diabetes
TAG	Triglyserider
TBP	TATA box bindende protein
TCA	Trikarboksylsyre syklus
TNF- $\alpha$	Tumor nekrosefaktor- $\alpha$
VLDL	Very low-density lipoprotein
WT	Wild-type/Villtype

# Innholdsfortegnelse

1	Innledning.....	1
1.1	Metabolsk syndrom .....	1
1.1.1	Abdominal fedme .....	1
1.2	Insulinresistens i skjelettmuskel .....	2
1.3	Fettsyremetabolisme i skjelettmuskel.....	4
1.3.1	Opptak av fettsyrer .....	4
1.3.2	Fordeling av fettsyrer i cellen.....	5
1.3.3	$\beta$ -oksidasjon, TCA syklus og oksidativ fosforylering.....	7
1.3.4	Lipid-indusert mitokondrielt stress og insulinresistens.....	8
1.3.5	Lipolyse .....	8
1.3.6	Lipiddråper .....	9
1.3.7	PAT familien .....	10
1.3.8	Perilipin 2 (PLIN2).....	11
1.4	Peroksisom proliferator-aktiverte reseptorer (PPAR) .....	13
1.4.1	PPAR $\alpha$ .....	13
1.4.2	PPAR $\delta$ .....	14
1.5	Glukosemetabolisme i skelettmuskulatur .....	14
1.5.1	Glykolyse og glukoseoksidasjon .....	15
1.5.2	Lagring av glukose .....	15
1.5.3	Randle syklus .....	15
1.6	Substanser benyttet under forsøkene .....	17
1.6.1	GW501516 .....	17
1.6.2	Karbonylcyanid p-trifluorometoksyfenylhydrazon (FCCP) .....	17
1.6.3	Triacsin C .....	17
1.6.4	Salbutamol.....	18
1.7	Mål for oppgaven.....	19
2	Materialer og metoder .....	20
2.1	Materialer.....	20
2.2	Celledyrking .....	21
2.2.1	Cellekarakteristika.....	21
2.2.2	Uttak av celler fra cellebank og utsåing .....	21

2.2.3	Opprensing og hurtigsplitt.....	21
2.2.4	Nedfrysing av celler til cellebank.....	22
2.2.5	Utsåing til forsøk.....	23
2.3	Substratoksidasjonsforsøk .....	23
2.3.1	Forbehandling med radioaktiv oljesyre.....	25
2.3.2	Måling av celleassosiert radioaktiv oljesyre og glukose.....	25
2.4	Scintillation proximity assay (SPA) .....	26
2.5	Proteinmåling (Bradford metoden).....	27
2.6	Analyse av syreløselige metabolitter (ASM).....	27
2.7	Lipidfiltrering .....	28
2.8	Real-time qPCR.....	28
2.8.1	Isolering av total RNA .....	29
2.8.2	Kvantifisering av RNA.....	30
2.8.3	cDNA syntese.....	30
2.8.4	Real-time qPCR.....	32
2.9	Live cell imaging .....	36
2.10	Statistiske analyser.....	37
3	Resultater.....	38
3.1	Identifisering av <i>PLIN2-KO</i> myotuber ved qPCR.....	38
3.2	Lagring av lipiddråper .....	40
3.3	Opptak, akkumulering og oksidasjon av oljesyre og glukose .....	43
3.4	Effekt av «kald» glukose på oljesyreoksidasjon og «kald» oljesyre på glukoseoksidasjon .....	47
3.5	Effekt av GW501516 på opptak, akkumulering og oksidasjon av oljesyre og glukose	48
3.6	Effekt av FCCP på oljesyreoksidasjon og glukoseoksidasjon.....	49
3.7	Total oljesyreoksidasjon .....	51
3.8	Kronisk akkumulering av oljesyre ved ulike oljesyrekonsentrasjoner.....	52
3.8.1	Analyse av syreløselige metabolitter (ASM) .....	53
3.9	Total lipolyse av oljesyre ved forskjellige oljesyrekonsentrasjoner.....	54
3.10	Reforestring.....	56
3.11	Lipidfiltrasjon .....	57
3.12	Effekt av 24 timers formerking med oljesyre .....	58

3.12.1	Analyse av syreløselige metabolitter (ASM) etter 24 timer formerking.....	61
3.13	Genekspresjonsstudier (qPCR) .....	61
4	Diskusjon.....	65
4.1	Oppsummering av oppgavens hovedfunn .....	65
4.2	Betydning av PLIN2 for lipidmetabolisme i skjelettmuskel .....	67
4.3	Betydning av PLIN2 for glukosemetabolisme i skjelettmuskel .....	72
4.4	PLIN2s påvirkning av genekspresjon i skjelettmuskel.....	73
4.5	Veien videre.....	74
5	Konklusjon .....	75
	Litteraturliste .....	76
6	Vedlegg .....	80
6.1	Medier til celledyrking .....	80
6.1.1	Proliferasjonsmedium .....	80
6.1.2	Hans F-10/DMEM-basert vekstmedium .....	80
6.1.3	Fusjonsmedium (differensieringsmedium) .....	80
6.1.4	Frysemedium.....	81
6.2	0,01 % kollagen I-behandlede celleflasker.....	81
6.3	Andre medier .....	81
6.3.1	1x Høstebuffer (PBS) .....	81
6.3.2	DPBS m/Hepes.....	82
6.4	Akuttmedier til substratoksidasjonsforsøk .....	82
6.4.1	[1- <sup>14</sup> C]oljesyre (0,5 µCi/ml, 100 µM) .....	82
6.4.2	D-[ <sup>14</sup> C(U)]glukose (0,3 µCi/ml, 100 µM).....	82
6.5	Medier til substrate proximity assay (SPA).....	83
6.5.1	Pulsmedium.....	83
6.5.2	Colorless DMEM 1 g/l fusjonsmedium .....	84
6.5.3	Chasemedium.....	84
6.6	Live cell imaging .....	85
6.6.1	PBST-BSA .....	85
6.7	Real-time qPCR.....	85
6.7.1	Primere til real-time qPCR med SYBR Green 1 .....	85
6.7.2	TaqMan <sup>®</sup> Gene expression assay .....	86
6.8	Lipolyse ved tilnærmet lik mengde OA akkumulert .....	87







# 1 Innledning

## 1.1 Metabolsk syndrom

Metabolsk syndrom er en samlebetegnelse på en rekke metabolske forstyrrelser, som alle utgjør en økt risiko for hjerte-kar sykdommer og type 2 diabetes (T2D). Det har i de siste to tiårene vært en enorm vekst i antall personer med metabolsk syndrom, noe som har en direkte sammenheng med den globale epidemien av fedme og diabetes [1]. «The international diabetes federation» (IDF) estimerer at omtrent 20-25 % av verdens voksne befolkning har metabolsk syndrom, og dermed har en dobbelt så høy risiko for å dø av, og tre ganger høyere risiko for å rammes av, et hjerteanfall eller slag [2]. IDF definerer metabolsk syndrom som sentralfedme eller kroppsmasseindeks,  $KMI > 30 \text{ kg/m}^2$  i tillegg til minst to av følgende tilstander: økt plasmaglukose under faste (eller tidligere diagnostisert T2D), hypertensjon, dyslipidemi med forhøyede triglyserider eller lavt nivå av HDL-kolesterol [2]. Det er ikke fullstendig klarlagt hva som er årsaken til metabolsk syndrom. Arv spiller en rolle, sammen med abdominal fedme og insulinresistens. Hovedelementene i behandlingen av metabolsk syndrom er vektreduksjon og økt fysisk aktivitet. I tillegg kan medikamentell behandling av de ulike faktorene redusere risikoen for utvikling av hjerte-kar sykdommer og T2D [1].

### 1.1.1 Abdominal fedme

Fedme spiller en sentral rolle i utviklingen av metabolsk syndrom, da særlig visceral eller abdominal fedme. Individer med abdominal fedme viser en større tendens til å utvikle metabolsk syndrom enn individer med subkutan fedme. Hyperlipolytisk abdominalt fettvev er immunt mot insulins antilipolytiske effekt, noe som forstyrrer metabolismen av frie fettsyrer (FFA). En større mengde FFA blir frigjort ved lipolyse fra triglyserider (TAG), og på grunn av den anatomiske plasseringen av fettvevet, fraktes disse via portalvenen til leveren i stedet for å gå ut i den systemiske sirkulasjonen slik tilfellet er for FFA fra subkutan fettvev. Dette påvirker levermetabolismen på flere måter, og kan føre til økt glukose produksjon, økt VLDL sekresjon og redusert clearance av insulin og apolipoprotein B, noe som kan føre til dyslipidemi, hypeinsulinemi og glukoseintoleranse [3]. Fettvev har i senere år også vist seg å være et endokrint organ, som skiller ut protrombotiske og inflammatoriske molekyler, kalt adipokiner. Personer med abdominal fedme er i en kronisk inflammatorisk tilstand, med økte

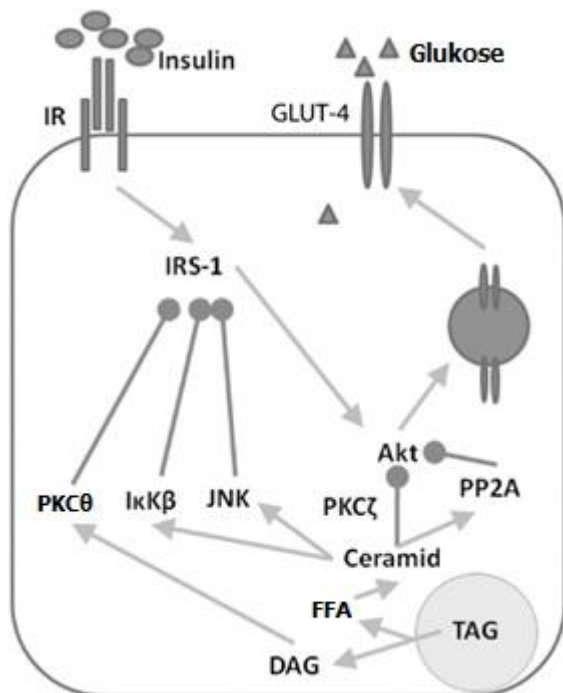
verdier av c-reaktivt protein (CRP) som følge av utskilling av proinflammatoriske cytokiner som IL-6 og TNF- $\alpha$ , som også gir økt risiko for insulinresistens [3, 4].

## 1.2 Insulinresistens i skjelettmuskel

Insulin er det viktigste hormonet for å regulere nivået av glukose i blodet, og sekreseres fra pankreas etter inntak av et måltid. Hos friske individer stimulerer insulin opptak av glukose i fett og muskel, fremmer lagring av glukose som intracellulære TAG og glykogen, samt hemmer produksjonen og frigjøringen av glukose fra lever (glukoneogenesen og glykogenolysen). Til sammen bidrar dette til å holde nivået av glukose i blodet nede [5].

Insulin stimulerer opptak av glukose i skjelettmuskel ved å binde til insulinreseptorer på overflaten av muskelcellen. Bindingen fører til fosforylering og aktivering av reseptor tyrosin kinase, som igjen fosforylerer en rekke intracellulære substrater, inkludert insulin reseptor substrat (IRS) 1 og 2. IRS aktiverer så fosfoinositid-3-kinase (PI3K), som igjen fører til translokasjon av GLUT4 reseptorer via AKT og aPKC. GLUT4 flyttes fra intracellulære vesikler til cellemembranen, hvor den fører til økt opptak av glukose. Det er denne signalveien som ikke fungerer som den skal ved insulinresistens. Det er vist redusert IRS 1 tyrosinfosforylering og redusert PI3K aktivitet hos overvektige og personer med T2D sammenlignet med friske. Reduksjonen i tyrosin fosforylering av IRS 1 og IRS 2 skyldes økt serin/treonin fosforylering av disse. Som et resultat av dette blir nivået av PI3K redusert, noe som fører til redusert aktivitet av aPKC og muligens AKT [6].

Mekanismene bak en slik insulinresistens er enda ikke fullstendig kartlagt. Et høyt nivå av TAG i blodet over tid som følge av et høyt fettinntak vil føre til «metning» av hvitt fettvev, og lipider vil akkumuleres i andre vev som har en begrenset kapasitet for lagring av lipider, som skjelettmuskel og lever. Slik abnormal ektopisk lipidakkumulering i form av intramyocellulære lipider (IMCL) i skjelettmuskel er sterkt assosiert med insulinresistens. Intravenøs injeksjon av lipider er en godt dokumentert metode for å indusere insulinresistens. Likevel er det økende beviser som tyder på at fettsyremetabolitter som diacylglyserol (DAG), acyl-coenzym A (acyl-CoA) og ceramider antagelig spiller en større rolle enn IMCL i utviklingen av lipid-indusert insulinresistens [7].



**Figur 1: Fettsyremedierte insulinresistens.** FFA fra blodet eller IMCL påvirker insulinsignaleringskaskaden i skjelettmuskel. FFA kan syntetiseres til ceramid, som via aktivering av PP2A og PKC $\zeta$  deaktiverer Akt. DAG hemmer IRS-1 via aktivering av PKC $\theta$ , og ceramid hemmer muligens IRS-1 via aktivering av JNK og I $\kappa$ K $\beta$ . Dette hemmer inulinsignaleringskaskaden, og hindrer translokasjon av GLUT4. Modifisert fra [8].

DAG kan genereres via nedbrytning av fosfolipider, bli syntetisert fra langkjedet acyl-CoA eller genereres via TAG hydrolyse [9], og nivået er økt hos overvektige personer. Det er foreslått at DAG induserer insulinresistens ved å aktivere en undergruppe av protein kinase C familien, PKC $\theta$ . PKC $\theta$  katalyserer serinfosforyleringen av IRS-1, som igjen reduserer tyrosinfosforyleringen av denne og hindrer aktivering av PI3K som beskrevet over. Dette gir redusert translokasjon av GLUT4, og hemmer insulinmediert opptak av glukose i cellen. Reduksjon av DAG gjennom økt fettsyreoksidasjon og økt IMCL syntese har blitt assosiert med forbedring av insulinsensitivitet [6, 7].

Ceramid er derivert fra lang-kjedede mettede fettsyrer, og har blitt observert i høyere nivåer hos overvektige mennesker med insulinresistens [6]. Ceramid syntetiseres fra FFA, og hemmer insulinsignaleringskaskaden via AKT og muligens IRS-1. Effekten på insulinresistens virker mest gjennom hemming av AKT ved defosforylering av denne, noe som medieres av protein fosfatase 2A (PP2A). Ceramid hemmer også translokasjon av AKT, muligens ved PKC $\zeta$ -mediert fosforylering. Mulig hemming av IRS-1 tyrosinfosforylering er fremdeles omdiskutert [8].

Også sammensetningen av typer fettsyrer, da med tanke på om de er mettede og om de er langkjedede, påvirker insulinresistens i skjelettmuskel. Insulinresistens har blitt vist å korrelere med økt mengde mettede fettsyrer i IMCL og langkjedet acyl-CoA innhold i skjelettmuskel. Myotuber fra mus (C2C12 celler) som ble eksponert for oljesyre eller kortkjedede mettede fettsyrer genererte mindre DAG og ceramid og viste mindre hemming av AKT enn myotuber som ble eksponert for palmitinsyre (16:0) og andre langkjedede mettede fettsyrer [6].

Til tross for at økt nivå av IMCL er klart assosiert med økt insulinresistens ved overvekt og T2D, er det funnet unntak fra denne regelen. Høyt nivå av IMCL vil ikke alltid føre til insulinresistens. Det ble funnet like høye nivåer av IMCL hos idrettsutøvere som var godt trente i utholdenhetstrening, som det ble observert i overvektige, insulinresistente personer [10]. Det er faktisk vist at økt IMCL er en tidlig respons på trening. Dette refereres til som «idrettsparadokset», og stemmer overens med hypotesen om at det er intermediater som DAG og ceramid som fører til insulinresistens, og ikke økt mengde LD i seg selv. Balansen mellom LD syntese og degradering, LD dynamikk, bestemmer delvis mengden av slike lipid-deriverte intermediater [11].

## **1.3 Fettsyremetabolisme i skjelettmuskel**

Skjelettmuskel utgjør omtrent 40 % av kroppsmassen, og er det organet som forbruker mest energi. Det står for en stor andel av kroppens fettsyreopptak og oksidasjon, og omtrent 80 % av kroppens insulin-stimulerte glukoseopptak [8].

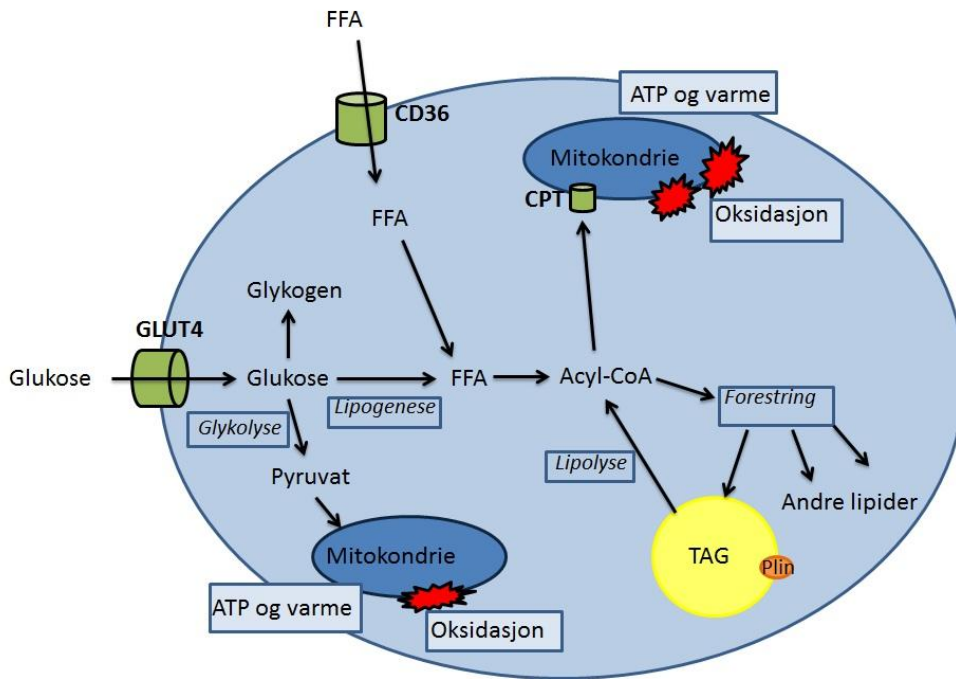
### **1.3.1 Opptak av fettsyrer**

Siden skjelettmuskel har et stort energibehov, og kun en begrenset kapasitet for å lagre energi, må fettsyrer (FFA) fra fettvev eller fra triglyseridrike lipoproteiner (for eksempel VLDL) tas opp i muskelcellene fra blodet. Opptak skjer både via passiv diffusjon og ved protein-mediert transport over cellemembranen. De membranassosierte proteinene som er involvert inkluderer fettsyre translokase (FAT)/CD36, plasma membran-bundet fettsyre bindende protein (FABPpm) og fettsyre transport protein (FATP) [12]. FABPpm og FAT/CD36 blir uttrykt proporsjonalt med muskelvevs oksidative kapasitet (hjerne>>skjelettmuskel). FAT/CD36 er den transportereren som er best kjent, og lagres i intracellulære depoter. Ved muskelkontraksjon

og insulinstimulering translokeres FAT/CD36 til cellemembranen, hvor den øker opptak av FFA fra blodet [13]. FATP1 er den typen FATP som det er mest av i fettvev og skjelettmuskel. Studier har vist at FATP1 translokeres til cellemembranen som respons på insulinstimulering. Translokasjon av FATP1 korrelerer med økt fettsyreopptak i skjelettmuskel. Dersom FATP1 fjernes i mus, stopper det insulin-medierte fettsyreopptaket nesten helt opp, noe som tyder på at FATP1 er en insulin-mediert fettsyreopptakstransportør som er analog med glukosetransportøren GLUT4. Likevel blir ikke basal opptaket endret, noe som forklares ved at det er flere mekanismer for fettsyreopptak [14].

### **1.3.2 Fordeling av fettsyrer i cellen**

Etter at fettsyrene er kommet gjennom cellemembranen, blir de transportert videre intracellulært ved å bindes til fettsyrebindende proteiner i cytosol (FABPc). FFA blir så aktivert av acyl-CoA syntetase til langkjedet acyl-CoA, før de blir fraktet videre via acyl-CoA bindene protein (ACBP) til mitokondrier og peroksisomer. Her gjennomgår langkjedet acyl-CoA  $\beta$ -oksidasjon, som innebærer at fettsyren brytes ned og inngår i Krebs syklus for å produsere energi i form av ATP og varme [15]. For å komme inn i mitokondriene må langkjedet acyl-CoA krysse mitokondriens ytre og indre membran. Denne prosessen foregår ved hjelp av et karnitinavhengig transportsystem, som består av karnitinpalmitoyltransferase-1 (CPT-1), karnitintranslokase (CAT) og karnitinpalmitoyltransferase-2 (CPT-2). Det hastighetsbestemmende trinnet i denne prosessen avhenger av CPT-1, som er lokalisert i den ytre mitokondriemembranen. CPT-1 omdanner langkjedet acyl-CoA til acylkarnitin, som så blir transportert over den indre mitokondriemembranen av CAT. Når acylkarnitin når mitokondriens matrix, konverteres den tilbake til langkjedet acyl-CoA av CPT-2, og kan deretter inngå i  $\beta$ -oksidasjon (avsnitt 1.3.3) [16].



**Figur 2: Energimetabolisme i skjelettmuskel.** Fettsyrer som tas opp fra blodet blir omdannet til acyl-CoA. Acyl-CoA kan enten bli oksidert i mitokondriene, bli reforestret til andre lipider eller lagret som TAG i lipiddråper (LD). TAG lagret i LD kan via lipolyse igjen danne acyl-CoA, som kan brukes til energiproduksjon i mitokondriene. Også glukose kan via lipogenese omdannes til fettsyrer (FFA) i cellen.

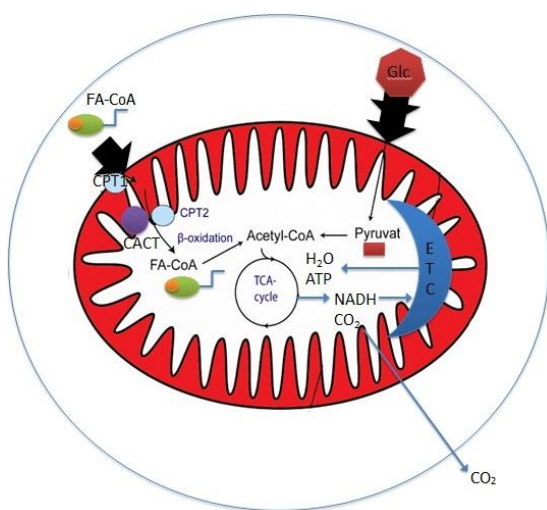
Når nivået av FFA som tas opp overstiger energibehovet cellen har på det tidspunktet, kan acyl-CoA også fraktes til endoplasmatisk retikulum (ER), hvor det blir reforestret til forskjellige typer lipider, som TAG, fosfolipider og kolesterylester. TAG og kolesterylester lagres i lipiddråper (LD), som et depot av energi som kan brukes ettersom cellen har behov for det (figur 2).

FFA i cellen kan virke som ligander for kjernereseptorer, for eksempel peroksisomproliferatoraktivert reseptor (PPAR) familien (avsnitt 1.4), og dermed regulere genekspressjon, samt modulere enzymer og proteiner som er viktige for lipidmetabolismen. Produktene fra hydrolyse av TAG (DAG) kan påvirke signalering i cellen. Dersom det blir for høye nivåer av FFA kan det forstyrre integriteten til fosfolipidmembranen, endre lipid signalveier og indusere apoptose. Da virker pakkingen av TAG i lipiddråper som en måte å regulere tilgjengeligheten av energisubstrater og lipidsignalmolekyler, og beskytter mot potensielt toksiske metabolitter [16]. Glukoseverdier over energibehovet til cellene kan være med på å øke nivået av FFA i muskel ved at glukose blir omdannet til FFA (lipogenese) [15].



### 1.3.3 $\beta$ -oksidasjon, TCA syklus og oksidativ fosforylering

Inne i mitokondriene blir langkjedet acyl-CoA oksidert via en serie av fire enzymer, hvor hver syklus korter ned fettsyrekjeden med to karbonatomer fra karboksylenden og genererer ett acetyl-CoA molekyl samt ett molekyl hver av NADH og FADH<sub>2</sub>. Det er denne prosessen som kalles  $\beta$ -oksidasjon. Acetyl-CoA derivert fra  $\beta$ -oksidasjon kan så gå inn i TCA syklusen (Krebs syklus, sitronsyresyklus). TCA syklusen katalyserer den totale oksidasjonen av karbonatomer fra acetyl-CoA, og konverterer dem til CO<sub>2</sub>. Acetylgruppen fra acetyl-CoA blir overført til oxaloacetat, og det dannes sitronsyre. Sitronsyre blir så gradvis oksidert i en kjede av åtte reaksjoner, som ender opp i regenerering av oxaloacetat, og det dannes en syklus. Hver runde av syklusen produserer energirike molekyler, NADH og FADH<sub>2</sub>. Disse blir brukt i mitokondrienes elektrontransportkjede (ETC) for å produsere ATP, en prosess som kalles oksidativ fosforylering [16, 17]. CO<sub>2</sub> er et biprodukt fra denne reaksjonen, og skilles ut fra cellen. Ved oksidativ fosforylering overfører NADH og FADH<sub>2</sub> de ekstra elektronene de har fått ved å oksidere andre molekyler, til en kjede av spesialiserte elektronakseptorer og donorer som sitter i den indre membranen i mitokondriene. Elektronene vandrer gjennom kjeden, til stadig lavere energitilstander. Energien som frigjøres brukes til å drive protoner (H<sup>+</sup>) over den indre mitokondriemembranen, noe som skaper en protongradient (elektrokjemisk gradient). Denne gradienten brukes for å drive energikrevende reaksjoner, hovedsakelig fosforylering av ADP til ATP, kroppens hovedkilde til energi. Elektronene ender til slutt opp med å redusere O<sub>2</sub> til H<sub>2</sub>O, og når med dette sitt laveste energinivå. All tilgjengelig energi har nå blitt ekstrahert fra FFA ved hjelp av oksidasjon (figur 3) [17].



**Figur 3: Energiproduksjon i mitokondrier.** Fettsyrer og glukose oksideres til acetyl-CoA, som går inn i TCA syklus og produserer NADH, som igjen driver elektrontransportkjedens produksjon av ATP og H<sub>2</sub>O.

### 1.3.4 Lipid-indusert mitokondrielt stress og insulinresistens

Ved et høyt inntak av fettsyrer gjennom maten, vil aktivering av PPAR og økt substrattilgang oppregulere  $\beta$ -oksidasjonen av langkjedet acyl-CoA til acetyl-CoA. Dersom fysisk aktivitet ikke økes tilsvarende, forblir TCA syklusen inaktivert på et transkripsjonelt nivå, og begrenses av mangel på nødvendige intermediater og redoks press. Fluks gjennom TCA vil ikke være stor nok til å forbruke mengden acetyl-CoA som produseres via  $\beta$ -oksidasjon, og acetyl-CoA akkumuleres i mitokondriene. Dette kan føre til ufullstendig  $\beta$ -oksidasjon, som igjen fører til dannelse av metabolske biprodukter fra acetyl-CoA som acylkarnitiner, ketoner, NADH, ROS og RNS. Akkumulering av disse fører til oksidativt og reduktivt stress i mitokondriene, og gjør at langkjedet acyl-CoA blir omdirigert til lagring som TAG eller det dannes signalerings-intermediater som DAG og ceramid. Det er vist at også acylkarnitiner kan (i likhet med DAG og ceramid) hemme insulinsignalerings ved å øke serinfosforylering, og dermed hindre translokasjon av GLUT4 til cellemembranen. Dette er en foreslått mekanisme for hvordan økt fettinntak kombinert med inaktivitet kan føre til insulinresistens [18].

### 1.3.5 Lipolyse

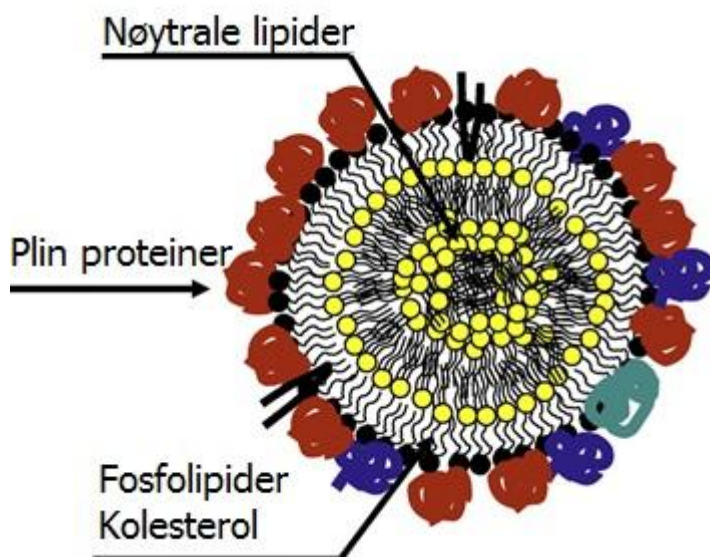
Lipolyse er en prosess hvor fettcellene i kroppen frigjør lagret energi fra TAG, som respons på økt energibehov ved faste eller ved akutt stress. Lipolyse ved fasting er karakterisert av økt behov for FFA fra fettvev for å dekke energibehovet. Lipolyse utløst av stress er kortvarig og mer intenst, og avhenger av stimuli fra katekolaminer som adrenalin. Det skilles mellom basal lipolyse og stimulert lipolyse (av hormoner eller andre stoffer) [19]. Lipolyse i adipocytter finner sted ved overflaten av lipiddråper i cellens cytosol. Minst to forskjellige lipaser er viktige for lipolyse, hormonsensitiv lipase (HSL) og adipocytt triglyserid lipase (ATGL). ATGL hydrolyserer TAG til diacylglycerol (DAG) og ett FFA molekyl. DAG blir så hydrolysert videre av HSL til monoacylglycerol (MAG) og enda ett FFA molekyl. MAG lipase hydrolyserer så MAG, og produserer glyserol og et tredje FFA molekyl.

Glukokortikoider vil oppregulere ATGL transkripsjonelt, mens katekolaminer via  $\beta$ -adrenerge reseptorer genererer en signal kaskade som øker nivået av cAMP, som igjen aktiverer protein kinase A (PKA). PKA fosforylerer HSL, som resulterer i at denne translokeres fra cytosol til lipiddråpen, hvor den kan hydrolysere DAG. PKA fosforylerer også det lipiddråpeassosierte proteinet perilipin (avsnitt 1.3.6), som gir lipasene bedre tilgang til lipiddråpen ved å frigjøre

CGI-58, som igjen aktiverer ATGL til å starte den lipolytiske prosessen [20]. Etter et måltid (postprandialt) vil insulin binde til insulinreseptor i adipocytene og via fosforylering av fosfodiesterase 3B (PDE3B) redusere cAMP og hemme lipolyse av TAG [21].

### 1.3.6 Lipiddråper

Lipiddråper (LD) er en dynamisk organelle som befinner seg i cytosol i mange eukaryote celler. De fungerer som et intracellulært lipidreservoar med byggesteiner til membraner og substrater til energimetabolisme. En lipiddråpes kjerne består av nøytrale lipider, hovedsakelig i form av triacylglycerol (TAG), men også sterolestere og andre endogene nøytrale lipider som fritt kolesterol og retinolestere. Et monolag av fosfolipider og proteiner skiller den hydrofobe kjernen fra cytosol (figur 4) [22, 23].



**Figur 4: Oppbygning av en lipiddråpe (LD).** Kjernen av en LD består av nøytrale lipider (TAG, kolesterolester), og er pakket inn i et monolag av fosfolipider samt LD assosierte proteiner (Plin proteiner).

Nøytrale lipider syntetiseres i ER, og syntesen blir katalysert av ulike enzymer. Enzymer som acyl-coenzym A (acyl-CoA) og diacylglycerol acyltransferase (DGAT), DGAT1 og DGAT2, syntetiserer TAG. Sterolestere syntetiseres av acyl-CoA kolesterol acyltransferase (ACAT) enzymer, ACAT1 og ACAT2. Mye tyder på at lipiddråper som inneholder disse synteseproduktene dannes fra ER, hvor enzymene som syntetiserer dem befinner seg. Mekanismen for hvordan LD dannes er ikke fullstendig kartlagt, og det er uklart hvordan et fosfolipid monolag kan oppstå fra en to-lags membran [23]. Én hypotese går ut på at nøytrale

lipider akkumulerer mellom fosfolipid bilagene til ER, i en linseaktig form, og at LD etter hvert avsnøres fra denne (budding) [24].

### 1.3.7 PAT familien

LD i celler fra forskjellige vev inneholder én eller flere av 5 strukturelt relaterte proteiner: perilipin (PLIN1), adipofilin (PLIN2), TIP47 (PLIN3), S3-12 (PLIN4) og OXPAT/MLDP (PLIN5). Til sammen utgjør disse proteinene PAT-familien (fra perilipin, adipofilin og TIP47) av proteiner, og er hovedgruppen av proteiner som befinner seg på overflaten av LD [24]. Medlemmene i PAT familien er alle regulatoriske proteiner som styrer LD i cellen, og som skiller seg fra hverandre både i størrelse, vevsekspresjon, affinitet for å binde lipiddråper, stabilitet når de ikke er bundet, og transkripsjonell regulering [25].

PLIN1, eller perilipin, var det første av disse proteinene som ble oppdaget og er det som er mest studert. PLIN 1 er uttrykt særlig i fettvev, hvor det befinner seg på overflaten til LD og regulerer både basal og hormonelt stimulert lipolyse. Lipolyse er hydrolyse av lagrede TAG, og er måten fettsyre blir mobilisert til membranproduksjon eller som substrat for energiproduksjon (avsnitt 1.3.5). PLIN1 er et substrat for cAMP-avhengig protein kinase A (PKA) i lipolytisk stimulert fettvev. Under basalforhold begrenser PLIN1 tilgangen av lipaser fra cytosol til LD, og fremmer dermed TAG lagring. Når kroppen har for lite energi, blir PLIN1 fosforylert av PKA og setter i gang maksimal lipolyse via lipaser. Altså regulerer PLIN1 lipiddråpers tilgang på lipolytiske enzymer som respons på fettvevets metabolske status. PLIN1 induseres blant annet av PPAR $\gamma$  [24, 25].

Både PLIN1 og PLIN2 finnes hovedsakelig bundet til LD i cellen, og vil raskt bli degradert dersom de er løst i cytosol, mens de øvrige PLIN-proteinene kan veksle mellom å være løst i cytosol og bundet til LD etter behov. PLIN3 og PLIN4 er generelt assosiert med mindre LD, mens PLIN1 og PLIN2 tar mer og mer over ettersom LD modner, noe som kan tyde på at PLIN3 og PLIN4 har en rolle i differensiering av LD i ulike stadier av LD syntese, i motsetning til å påvirke lipolyse. Også PLIN2 har tilsynelatende en annen rolle i fettceller, da LD coatet med PLIN2 ikke rekrutterte lipase koaktivatoren CGI-58 til lipiddråpene like effektivt som PLIN1 eller PLIN5. PLIN5 øker ATGL aktivitet, og er nylig vist å rekruttere mitokondrier til overflaten av LD, noe som indikerer en rolle i lipolyse og oksidering av lagrede lipider [26].

I skjelettmuskel er det uttrykt veldig lite PLIN1, og fokus i forhold til IMCL dråper har vært på å forstå funksjonen til de resterende PLIN proteinene [26].

### **1.3.8 Perilipin 2 (PLIN2)**

Perilipin 2 (adipofilin, adipose differensierings-relatert protein, ADRP) finnes i et bredt utvalg av celletyper og vev, inkludert skjelettmuskel [27, 28]. Det er et 50 kDa lipidbindende protein, som blir transkripsjonelt aktivert når preadipocytter differensierer til modne adipocytter. Det er fremdeles uklart hvilke funksjoner PLIN2 har i ulike vev. Genet som koder for PLIN2 er en av flere gener i nyrer som er involvert i lipidtransport, akkumulering og lagring som reguleres av PPAR $\alpha$ , hvor PPAR $\alpha$  stimulerer til økt lipidakkumulering [29]. Det er funnet at PLIN2 genekspressjon kan stimuleres av ligandbinding til PPAR $\alpha$  og PPAR $\delta$  [11]. I en studie fra 2001 hvor perilipin (PLIN1) sin rolle i fettvev ble studert ved hjelp av knock-out (KO) mus for dette proteinet, fant man at ved fjerning av PLIN1 vil PLIN2 oppreguleres i fettvev. I fravær av PLIN1 vil altså PLIN2 coate LD i fettvev, men denne kompensatoriske mekanismen gjenoppretter likevel ikke cellenes fulle funksjon når det gjelder regulering av lipolyse, noe som tyder på at PLIN2 er en mindre robust barriere mot lipaser enn PLIN1 [25, 30]. I tidlige studier ble det spekulert i om PLIN2 kan ha samme rolle i skjelettmuskel som PLIN1 i fettvev [26].

Det er vist at PLIN2 er det lipiddråpe assosierte proteinet som er høyest uttrykt i skjelettmuskel hos menneske, hvor det spiller en ikke enda fullstendig kartlagt rolle i LD metabolisme. En stor andel av arbeidet utført på cellekulturer peker mot en rolle i lipogenese og akkumulering av lipider i LD [11, 25]. Flere studier underbygger en rolle for PLIN2 i å hindre kontakt mellom lipaser og TAG i LD [25], og dermed påvirke lipolysen, men dette er fremdeles usikkert. Ved å uttrykke PLIN2 genet i celler som vanligvis ikke uttrykker denne, ble det funnet økte cellulære nivåer av TAG, og redusert TAG turnover. I tillegg ble ATGL mindre assosiert med LD i cellene, noe som tyder på at overekspressjon av PLIN2 kan redusere TAG hydrolyse ved å ekskludere ATGL fra LD [31]. Dette støttes av en studie hvor overekspressjon av PLIN2 signifikant reduserte TAG hydrolyse i hepatocytter, mens siRNA knock down (KD) av PLIN2 økte TAG hydrolyse [32]. Det ble også funnet at overekspressjon av ATGL og KD av PLIN2 aktiverte PPAR $\alpha$ , mens PLIN2 overekspressjon hemmet PPAR $\alpha$  aktivitet og fettsyreoksidasjon [32].

Det har blitt vist kjønnsforskjeller i forhold til mengde PLIN2 i skjelettmuskel. Innholdet av PLIN2 protein og mRNA var signifikant høyere hos kvinner enn hos menn, noe som sammenfaller med tidligere funn av et høyere nivå av IMCL hos kvinner. Dette støtter hypotesen om at PLIN2 spiller en rolle i lipidakkumulering [26].

I tillegg ble det funnet en korrelasjon mellom økt uttrykk av PLIN2 og økt insulinsensitivitet etter vekttap eller behandling med antidiabetika hos pasienter, noe som kan tyde på at PLIN2s regulering av LD har en beskyttende mekanisme gjennom organiseringen av IMCL [33]. I en annen studie er det funnet lavere uttrykk av PLIN2 i muskel hos insulinresistente pasienter [34].

I en studie av Bosma et al. ble C2C12 muse myotuber inkubert med forskjellige typer fettsyrer over natt (200  $\mu$ M) [35]. Oktanoat, som er en kortkjedet fettsyre som helst oksideres, ga ingen økning i TAG nivåer i myotubene, mens inkubering med palmitat eller OA førte til økt akkumulering av TAG i tillegg til å øke ekspresjonen av PLIN2. Effekten av PLIN2 på lagring av LD ble undersøkt ved hjelp av siRNA mediert PLIN2 knock-down (KD) av myotuber, med 90 % redusert PLIN2 mRNA nivå og 85 % redusert nivå av PLIN2 protein. KD av PLIN2 hemmet FFA induert TAG akkumulering og dannelse av LD både ved inkubering med palmitat og OA. Dette viser at PLIN2 er essensiell for TAG lagring i LD [35]. En kompensatorisk økning av PLIN3 ved fravær av PLIN2 ble ikke funnet, da PLIN2 KD ikke hadde noen innvirkning på protein ekspresjonen av PLIN3 [35].

Samme studie målte oksidasjon av  $^{14}\text{C}$  palmitat, og *PLIN2*-KD myotuber hadde en tendens til økt totaloksidasjon ( $p=0,055$ ). Denne tendensen reflekterer en økning i ufullstendig oksidasjon (syreløselige metabolitter – ASM), mens oksidasjon til  $\text{CO}_2$  ikke var påvirket. Altså var effekten av *PLIN2*-KD på palmitat oksidasjon beskjedent [35]. En annen mulighet for myotubene til å ta hånd om FFA ved fravær av cellulær TAG lagringskapasitet er å lagre FFA som andre lipidintermediater enn TAG. Etter inkubering med  $^{14}\text{C}$  palmitat i *PLIN2*-KD myotuber ble FFA i større grad inkorporert i DAG og fosfolipider enn i TAG, sammenlignet med kontrollmyotuber [35].

## 1.4 Peroxisom proliferator-aktiverte reseptorer (PPAR)

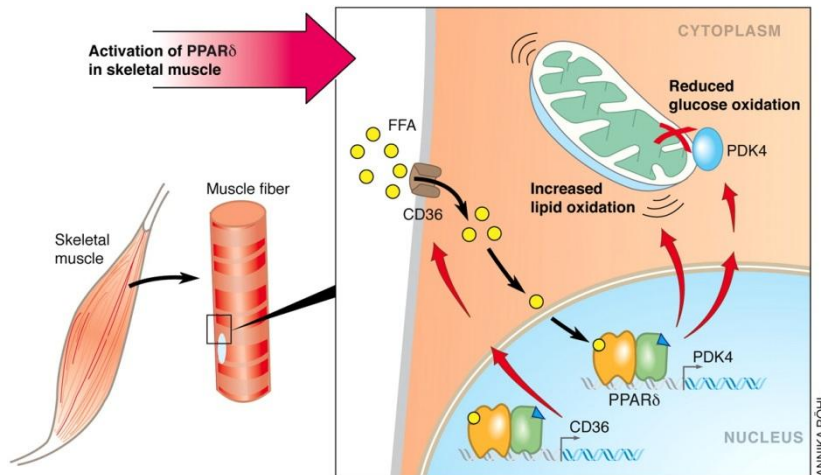
Peroxisom proliferator-aktivert reseptor familien (PPAR) er en familie av kjernereseptorer, som består av PPAR $\alpha$ , PPAR $\delta$  og PPAR $\gamma$ . Disse er en del av en større superfamilie av ligandavhengige transkripsjonsfaktorer [36]. PPARene binder til spesifikke elementer på DNA som heterodimere med retinoid X reseptorer (RXR). Ved fravær av ligand, rekrutterer PPAR-RXR heterodimeren co-repressorer, og hemmer transkripsjon av målgene. Ved binding av ligand induseres en endring i konformasjonen, som resulterer i økt ekspresjon av målgene. Det finnes et stort antall ligander som kan binde og aktivere PPAR, blant annet substanser derivert fra fettsyrer og endogen fettsyremetabolisme. Mange av målgene er involvert i lipidlagring, metabolisme og transport av FFA. I tillegg modulerer alle PPARene inflammatoriske prosesser [37]. De tre forskjellige PPAR subtypene varierer når det kommer til ligand spesifisitet, vevsfordistribusjon og biologisk funksjon [38].

### 1.4.1 PPAR $\alpha$

PPAR $\alpha$  var den første i PPAR familien som ble identifisert, og er uttrykt i vev med høy mitokondriell og peroksisomal fettsyre katabolisme, som lever, brunt fettvev, hjerte, skjelettmuskel, nyrer og tarm. Ligander som binder PPAR $\alpha$  kan være syntetiske eller endogene. Naturlige ligander er derivert fra FFA. PPAR $\alpha$  påvirker flere trinn i fettsyremetabolismen. PPAR $\alpha$  regulerer opptak og transport av FA inn i cellen, ved å stimulere gener som koder for FFA transport-proteiner, FFA translokase, og cytosol FFA bindende protein i lever. Etter passasje over plasmamembranen, stimulerer PPAR $\alpha$  til forestring av FFA til langkjedet acyl-CoA, og til transport inn i mitokondriene ved å stimulere CPT1 og CPT2. Aktivert acyl-CoA blir så oksidert av PPAR $\alpha$ -induserte enzymer i mitokondriene. Ved å stimulere oksidering av FA i lever, reduseres produksjonen av VLDL og TAG [38]. PPAR $\alpha$  virker primært i lever, mens i skjelettmuskel er det PPAR $\delta$  som er høyest uttrykt [37].

## 1.4.2 PPAR $\delta$

PPAR $\delta$  er den PPAR subtypen som er høyest uttrykt i skjelettmuskel, hvor den på samme måte som PPAR $\alpha$  er med på å regulere lipidmetabolismen. Aktivering av denne fører til økt HDL kolesterol, stimulerer fettsyre katabolisme og induserer energifrikobling [37].



**Figur 5: Effekter av aktivering av PPAR $\delta$  i skjelettmuskel.** FFA er en PPAR $\delta$  ligand, og ved binding av denne til kjernereseptoren vil det føre til økt ekspresjon av gener som er viktige for fettsyreoksidasjon. Fra [36].

PPAR $\delta$  øker ekspresjon av en rekke sentrale gener involvert i opptak av FFA i skjelettmuskel, som for eksempel CD36. Aktivering av PPAR $\delta$  fører også til økt lipidoksidasjon i cellen. Samtidig reduseres glukoseoksidasjonen gjennom økt uttrykk av pyruvat dehydrogenase kinase 4 (PDK4). PDK4 fosforilerer, og dermed inaktiverer, pyruvat dehydrogenase komplekset (PDK), som er viktig for karbohydratmetabolisme i skjelettmuskel. Aktivering av PPAR $\delta$  fører på den måten til en endring i skjelettmuskelmetabolisme mot å bruke FFA som energikilde fremfor glukose [36].

## 1.5 Glukosemetabolisme i skjelettmuskulatur

Glukose som tas opp fra kosten er kroppens hovedenergikilde sammen med fett (TAG). Mengden glukose i blodet er nøye regulert av forskjellige mekanismer, og varierer lite hos friske personer. Insulin-mediert glukoseopptak i perifere vev, da hovedsakelig skjelettmuskel, spiller en viktig rolle i koordineringen av glukose homeostasen [39].



### 1.5.1 Glykolyse og glukoseoksidasjon

Når glukose har blitt tatt opp i muskelcellen via GLUT4 (avsnitt 1.2), blir den fosforylert til glukose-6-fosfat av enzymet heksokinase. Dette er det første trinnet i glykolysen, en prosess som finner sted i cytosol og produserer ATP uten å forbruke molekylært oksygen ( $O_2$ ). Under glykolysen blir ett glukose molekyl kløyyt til to pyruvat molekyler. I alt involverer glykolysen en serie av 10 ulike reaksjoner, som hver produserer et sukkerintermediat og som katalyseres av forskjellige enzymer. I de tidlige stadiene av glykolysen forbrukes to ATP molekyler for å gi energi til å drive de første trinnene i reaksjonen. Sluttproduktene av glykolysen er fire ATP molekyler samt to molekyler NADH. NADH går inn i cellens elektrontransportkjede, hvor ATP blir produsert fra ADP og  $P_i$  ved hjelp av oksidativ fosforylering av NADH til  $NAD^+$  og dannelsen av  $H_2O$ . Pyruvatmolekylene som produseres i reaksjonen blir raskt transportert inn i cellenes mitokondrier, hvor de blir dekarboksylert av et kompleks bestående av tre enzymer, som kalles pyruvat dehydrogenase komplekset (PDK). Produktene fra dekarboksylering av pyruvat i mitokondriene er avfallsstoffet  $CO_2$ , ett NADH molekyl og acetyl-CoA. Acetyl-CoA blir så oksidert i TCA syklus til  $CO_2$  og  $H_2O$  samtidig som NADH blir produsert (figur 3). Dette står for hoveddelen av energiproduksjonen i eukaryote celler.  $NAD^+$  som produseres går så inn i glykolysen igjen, og er med på å holde syklusen gående [17].

### 1.5.2 Lagring av glukose

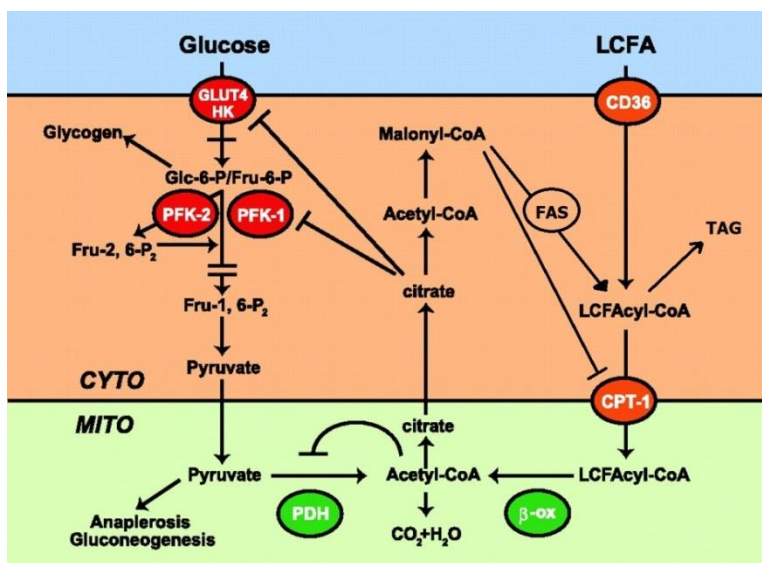
Glukose lagres i lever og skjelettmuskel som glykogen, som befinner seg som små granulater i cytosol. Syntese og degradering av glykogenlagre justeres etter cellens behov, og når mer ATP enn det som genereres fra næringsstoffer fra mat som tas opp i blodet er nødvendig, blir glykogen brutt ned i en reaksjon som produserer glukose 1-fosfat, som så kan gå inn i glykolysen. Dersom cellen får tilført mer glukose enn det er behov for, blir overflødig glukose lagret som glykogen eller brukt til å syntetisere fettsyrer (lipogenese) [17].

### 1.5.3 Randle syklus

Det er en dynamisk tilpasningsevne i fettvev og skjelettmuskel, hvor substrattilgangen til energiproduksjon kontrolleres under faste og etter et måltid. Som tidligere nevnt kontrollerer hormoner lipolyse i fettvev og den sirkulerende konsentrasjonen av FFA ved faste. I tillegg vil FFA så kontrollere valg av substrat til energiproduksjon i muskelceller [40]. Dette ble først beskrevet i 1963 av Randle et al., som foreslo en mekanisme for hvordan fettsyrer påvirker

glukosemetabolismen i skjelettmuskel gjennom en glukose-fettsyre syklus [41].

Fettsyreoksidasjon hemmer glukosemetabolismen ved å midlertidig inhibere flere trinn i glykolysen, da hovedsakelig glukosetransport (opptak) og fosforylering, 6-phosphofructo-1-kinase (PFK-1) og pyruvat dehydrogenase (PDH). Økt fettsyreoksidasjon øker rasjonene av acetyl-CoA/[CoA] og [NADH]/[NAD<sup>+</sup>] i mitokondriene, noe som hemmer aktiviteten av PDH, som igjen hindrer omdanning av pyruvat til acyl-CoA. Opphopning av citrat i cellens cytosol hemmer PFK-1, som igjen fører til økt mengde glukose 6-fosfat, som etter hvert vil hemme hexokinase. Mekanismene for hemming av glukoseopptak er enda ikke fullstendig kartlagt, men hemming av GLUT4 translokasjon har blitt observert (Figur 6) [40].



**Figur 6: Hemming av glukosemetabolisme ved økt opptak av fettsyrer fra (Randle syklus).** Produkter fra fettsyreoksidasjon vil hemme opptak og glykolyse av glukose. Ved invers Randle vil økt glukose føre til økt malonyl-CoA, som hemmer opptak av langkjedet acyl-CoA i mitokondriene ved å hemme CPT-1 og stimulerer lagring som TAG. Figur modifisert fra [40].

Fettsyrers hemming av glukoseutnyttelse i celler gir økt glukosekonsentrasjon i blodet og er en form for glukoseintoleranse som ligner på, og kan utvikle seg til, insulinresistens [40].

Dette er altså en av forklaringene for hvordan økt mengde FFA i blodet kan føre til insulinresistens [42].

Senere er det vist at også det motsatte av Randle syklus kan forekomme, en slags «invers Randle», hvor glukose hemmer fettsyreoksidasjon i cellene. [42] Glukosederivert acetyl-CoA omdannes av acetyl-CoA karboksylase (ACC) til malonyl-CoA. Malonyl-CoA hemmer transport av langkjedet acyl-CoA (LCFAcyl-CoA) over mitokondriemembranen ved å hemme

CPT-1, og stimulerer til økt forestring av FFA til TAG (figur 6). Dette fører til redusert oksidasjon og økt lagring av FFA [40, 42].

## 1.6 Substanser benyttet under forsøkene

### 1.6.1 GW501516

GW501516 er en potent, syntetisk og selektiv PPAR $\delta$  agonist [43], som induserer uttrykket at gener som er involvert i lipidopptak, lipidutnyttelse,  $\beta$ -oksidasjon, kolesteroleffluks og energiavkopling i skjelettmuskelceller. Den gir lignende effekter på lipidmetabolismen som de som observeres etter trening [43]. GW501516 er vist å øke lipidoksidasjonen ved økt uttrykk av CPT1 og PGC1 $\alpha$  (en viktig regulator av mitokondriell biogenese), men i en studie av Dimopoulos et al. ble det ikke funnet noen signifikante effekter på glukosemetabolismen i skjelettmuskel [44].

### 1.6.2 Karbonylcyanid p-trifluorometoksyfenylhydrazon (FCCP)

Energi skapes i celler ved fosforylering av ADP til ATP. Denne reaksjonen drives av en protongradient over den indre mitokondriemembranen, som igjen drives av energi som frigjøres fra elektroner fra NADH og FADH<sub>2</sub> som går gjennom elektrontransportkjeden (ETC) mot stadig lavere energitilstander (avsnitt 1.3.3) [17]. Karbonylcyanid p-trifluorometoksyfenylhydrazon, FCCP, er en svak syre som virker som en mitokondriell avkopler ved å transportere protoner over mitokondriemembranen og dermed redusere protongradienten. Dette hemmer koblingen mellom elektrontransport og fosforylering av ATP, noe som gjør at ATP syntesen hemmes uten at ETC påvirkes. På denne måten kan transporten av elektroner gjennom ETC fortsette uhemmet, uten at ATP syntetiseres, og cellene oppnår maksimal oksidativ kapasitet [45].

### 1.6.3 Triacsin C

Triacsin C brukes under lipolyseforsøk for å blokkere reutnyttelse av fettsyrer til TAG og oksidering, og virker ved å hemme enzymet acyl-CoA syntetase [46]. Triacsin C er en kompetitiv inhibitor av acyl-CoA syntetase, og ble vist å hemme *de novo* syntese av TAG, DAG og kolesterolestere med 93 %, mens syntese av fosfolipider ble hemmet med 83 % [47].

#### **1.6.4 Salbutamol**

Salbutamol er en selektiv  $\beta_2$ -reseptor agonist, som stimulerer lipolyse og dermed øker mengden FFA i blodet. Energiforbruket og fettsyreoksidasjonen øker ved stimulering med salbutamol.  $\beta_2$ -adrenerge reseptorer er hovedsakelig lokalisert i skjelettmuskel [48]. I en studie fra Bakke et al. økte lipolyse av OA med  $\approx 50$  % i humane myotuber etter inkubering med 100 nM salbutamol [49].

## 1.7 Mål for oppgaven

PLIN2 er et lipiddråpeassosiert protein, hvis rolle i celler enda ikke er fullstendig kartlagt.

Målet for denne oppgaven var å studere funksjonen til proteinet PLIN2 *in vitro* i skjelettmuskelceller fra mus. Dette gjøres ved å sammenligne myotuber som har slått ut genet som koder for PLIN2 (*PLIN2-KO*) med myotuber som har dette genet tilstede (*PLIN2-WT*). Metabolismen til ulike energisubstrater (fettsyre og glukose) studeres med og uten PLIN2 genet tilstede, ved å følge radioaktivt merkede substraters skjebne i myotubene. Effekten av tilsetning av ulike substanser for å påvirke substratmetabolismen sammenlignes også mellom disse to donorgruppene.

Kort oppsummert er målene for oppgaven å:

- identifisere *PLIN2-KO* myotuber ved qPCR for å verifisere cellemodellen
- undersøke innhold av lipiddråper (LD) ved live cell imaging
- undersøke opptak og oksidasjon av radioaktivt merket oljesyre (OA) og glukose
- studere effekt av aktivering av kjernereseptoren PPAR $\delta$  og mitokondriell avkobling på energimetabolismen
- undersøke real-time akkumulering av radioaktiv OA over 24 timer
- måle lipolyse og reforestring over 6 timer etter 24 timers forbehandling av radioaktiv OA
- studere opptak og oksidasjon etter 24 timers forbehandling av OA
- studere genekspressjon (mRNA) av ulike gener involvert i energimetabolismen ved qPCR

## 2 Materialer og metoder

### 2.1 Materialer

Ham's F10 Glutamax nutrient mixture, Dulbecco's Modified Eagle medium med Glutamax (1g/L glukose), Hanks Balance Salt Solution (HBSS), føtalt storfeserum (FBS), penicillin/streptomycin, Fungizone<sup>®</sup> (250 µg/ml amfotericin), basic Fibroblast Growth Factor (bFGF), trypsin (0,25 %), hesteserum og Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS m/Ca<sup>2+</sup> og Mg<sup>2+</sup>) ble kjøpt fra Gibco<sup>®</sup>, Life Technologies (Paisley, Scotland, UK). GW 501516 ble fremstilt av Calin Ciocoiu, Avdeling for farmasøytisk kjemi, Farmasøytisk institutt. L-carnitin, bovint serumalbumin (BSA), karbonylcyanid p-trifluorometoksyfenyl hydrazon (FCCP), HEPES, tryptanblått 0,4 % løsning, Collagen I, oljesyre (OA), salbutamol og triacsin C ble kjøpt fra Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). 96-brønners brett med flat bunn fra NUNC ble kjøpt fra Thermo Scientific (Danmark). 96-brønners Isoplate<sup>®</sup> ble kjøpt fra Wallac OY (Turku, Finland). 96 brønners Scintiplate<sup>®</sup> 96 TC var skaffet fra PerkinElmer (Groningen, Nederland). 96-brønners brett, 25 cm<sup>2</sup> celleflasker, 75 cm<sup>2</sup> celleflasker kjøpt fra NUNC (Roskilde, Danmark). 24-brønners brett med glassbunn ble kjøpt fra MatTek Corporation (Ashland, MA, USA). 12-brønners brett Corning<sup>®</sup> 12 Well Culture Cluster kjøpt fra Corning Inc. (Corning, NY, USA). [1-<sup>14</sup>C]oljesyre (54,4 mCi/mmol) og D-[<sup>14</sup>C(U)]glukose (3 mCi/mmol) ble kjøpt fra PerkinElmer (Boston, USA). Optiphase Supermix<sup>®</sup>, Unifilter<sup>®</sup>-96 GF/B og TopSeal<sup>®</sup>-A gjennomsiktig plastfilm ble kjøpt fra PerkinElmer (Shelton, Scotland, USA). BD Matrigel<sup>™</sup> matriks ble kjøpt fra BD Biosciences (Bedford, MA, USA). NaOH og Na<sub>2</sub>HPO<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O ble kjøpt fra VWR (Poole, England). NaCl, KCl og KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ble kjøpt fra Merck (Darmstadt, Tyskland). Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate ble kjøpt fra BioRad Laboratories (Hercules, CA, USA). Bodipy 493/503 (4,4-difluoro-1,3,5,7,8-pentamethyl-4-bora-3a, 4a-diaza-s-indacene), MitoTracker Red FM, Hoechst 33258 og primere til qPCR ble kjøpt inn fra Molecular Probes, Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). Agilent Total RNA isoleringskit ble kjøpt inn fra Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA). Quant-iT<sup>™</sup> RNA BR Assay kit ble kjøpt inn fra invitrogen (USA). High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, SYBR green master mix og MicroAmp<sup>®</sup> Optical Reaction Plate ble kjøpt fra Applied Biosystem (Warrington, UK). β-merkaptotanol ble kjøpt fra Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Primere til myotuber fra mus ble kjøpt fra Life Technologies (Carlsbad, CA). ABI Prism<sup>®</sup> Optical Reaction Plate, TaqMan<sup>®</sup> Universal

PCR Master Mix, TaqMan<sup>®</sup> Gene Expression Assay og High Capacity cDNA Reverse Transcription kit kjøpt fra ABI. Phosphate Buffered Saline uten Ca<sup>2+</sup> og Mg<sup>2+</sup>, Nucleic Acid Purification Elution Solution og PCR vann ble anskaffet fra Sigma-Aldrich. Andre kjemikalier og reagenser som ble benyttet var av analytisk kvalitet.

## 2.2 Celledyrking

### 2.2.1 Cellekarakteristika

I denne oppgaven ble det benyttet celler fra *PLIN2-WT* og *PLIN2-KO* mus. Musene ble avlet frem av Knut Tomas Dalen ved Avdeling for ernæringsvitenskap. Ved start av oppgaven var ferdig opprensede cellelinjer med myotuber fra fire ulike donorer tilgjengelig, to fra *PLIN2-KO* mus (KO4 og KO19) og to fra *PLIN2-WT* mus (WT2 og WT17). Myotubene fra disse donorene hadde allerede blitt brukt til forsøk tidligere. I tillegg var en ny cellelinje fra *PLIN2-KO* mus nylig rensset opp (KO5), samtidig som myotuber fra en *PLIN2-WT* mus var under opprensing (WT1).

### 2.2.2 Uttak av celler fra cellebank og utsåing

Satellittceller fra *PLIN2-WT* eller *PLIN2-KO* ble lagret i nitrogentank, og hentet opp for å så ut til forsøk eller til opprensing eller oppskalering. En ampulle (kryorør med celler) som tas opp blir tint raskt på vannbad ved 37 °C, og innholdet blir overført til et 50 ml sentrifugerør sammen med 5 ml vekstmedium eller proliferasjonsmedium. Cellesuspensjonen blir sentrifugert ved 2000 rpm i 5 minutter, før mediet suges forsiktig av med glasspipette og cellepelletten resuspenderes i 10 ml vekst- eller proliferasjonsmedium. Dette trinnet gjøres for å fjerne DMSO, som er celletoksisk i høy konsentrasjon. Cellene sås ut på en 75 cm<sup>2</sup> NUNC flaske med kollagen I coating (vedlegg 6.2) eller sås direkte ut til forsøk (avsnitt 2.2.5), og inkuberes ved 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>.

### 2.2.3 Opprensing og hurtigsplitt

Ikke alle satellittcellene var helt rene for fibroblaster, og for å fjerne fibroblaster ble det utført hurtigopprensing av cellene. Cellene ble dyrket på 75 cm<sup>2</sup> NUNC flasker med kollagen I coating og proliferert i prolifereringsmedium (vedlegg 6.1.1). For å fjerne fibroblaster ble

gammelt medium fjernet, cellene ble skylt 1 gang med 5 ml HBSS eller DPBS uten  $Mg^{2+}$  og  $Ca^{2+}$ , før 1 ml HBSS eller DPBS uten  $Mg^{2+}$  og  $Ca^{2+}$  tilsettes og cellene inkuberes i romtemperatur i noen minutter. Flasken bankes deretter forsiktig, og når man ser i mikroskopet at en del celler har løsnet, tilsettes 10 ml proliferasjonsmedium og cellene overføres til en ny 75 cm<sup>2</sup> NUNC flaske med kollagen I coating. Denne prosedyren utnytter at satellittcellene lettere løsner fra flasken og blir med over i ny flaske, mens fibroblastene sitter bedre fast og vil derfor sitte igjen i den gamle flasken. Det er derfor viktig ikke å dunke for hardt, slik at ikke fibroblastene også løsner. Proliferasjonsmedium gjør at satellittcellene vokser, men fibroblaster trives ikke i dette mediet og vil derfor ikke vokse opp.

Ved hurtigsplitt brukes 0,25 % trypsin for å få cellene til å løsne fra flasken, og dermed får man et større utbytte enn ved opprensing. Gammelt medium suges av med glasspipette, og cellene vaskes 1 gang med 2 ml (25 cm<sup>2</sup> flaske) eller 5 ml (75 cm<sup>2</sup> flaske) HBSS eller DPBS uten  $Ca^{2+}$  og  $Mg^{2+}$ . Etter skylling tilsettes 0,5 ml eller 1 ml 0,25 % trypsin, som fordeles godt over hele bunnen. Dette inkuberes noen få minutter ved romtemperatur, før flasken dunkes kraftig. Det kontrolleres i mikroskopet at cellene har løsnet før 10 ml vekstmedium (vedlegg 1.1.2) eller proliferasjonsmedium tilsettes. Cellesuspensjonen overføres til to nye 75 cm<sup>2</sup> flasker med kollagen I coating, 5 ml til hver. Til slutt tilsettes ytterligere 5 ml vekst- eller proliferasjonsmedium til hver av flaskene, før de inkuberes ved 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>.

#### **2.2.4 Nedfrysing av celler til cellebank**

Når cellene er 70-80 % konfluente ble gammel medium sugd av med glasspipette, og cellene vaskes 1 gang med 5 ml HBSS eller DPBS uten  $Ca^{2+}$  og  $Mg^{2+}$ . Etter skylling tilsettes 1 ml 0,25 % trypsin, som fordeles godt. Dette inkuberes noen få minutter ved romtemperatur før flasken dunkes kraftig, slik at cellene løsner fra bunnen. 2 ml vekstmedium tilsettes for å inaktivere trypsin. Skal flere flasker fryses kan celsuspensjonene slås sammen. Celsuspensjonen overføres til et sentrifugerør og sentrifugeres ved 1800 rpm i 5 minutter. Supernatanten suges av og kastes, og cellene resuspenderes i frysemedium (vedlegg 6.1.4). Omtrent 1,5 ml celsuspensjon i frysemedium overføres til hvert kryorør, som merkes med donor og passasjennummer. Man beregner 2 kryorør per 75 cm<sup>2</sup> flaske hvor cellene er ca. 80 % konfluente. Rørene fryses gradvis ned ved -20 °C i 30 minutter, deretter -80 °C over natten, før de flyttes til nitrogentanken ved -196 °C.



## 2.2.5 Utsåing til forsøk

Utsåing til forsøk ble utført enten direkte fra flaske eller ved å ta opp kryorør fra nitrogentank. 2 % Matrigel matriks ble benyttet for å coate brønnene 1 time før utsåing til forsøk. Matrigel danner raskt gel ved romtemperatur, og for å unngå dette ble Matrigel tint langsomt i kjøleskap og så jobbet videre med på is. Gelen ble fortynnet til riktig konsentrasjon (1:50 fortynning) ved å tilsette DMEM medium uten tilsetninger rett fra kjøleskap. Etter tilsetning av riktig fortynnet matrigel til hver brønn ble brettet satt til å lufttørke i 1 time inne i LAF-benken, før overskuddet av løsningen ble sugd av og kastet før cellene kunne sås ut på brettet.

Tabell 1: Utsåingsoversikt.

Type brønn	Antall (celler/brønn)	Mengde celler (µl/brønn)	Matrigel-fortynning (µl)	Metode
96 brønner (NUNC)	10.000	100 µl	50 µl	Substratoksidasjon
96 brønner (Scintiplate® 96 TC)	10.000	100 µl	50 µl	SPA
24 brønner glassbunn	30.000	500 µl	250 µl	Live cell imaging
12 brønner (Corning®)	60.000	1000 µl	500 µl	Kvantitativ real time qPCR

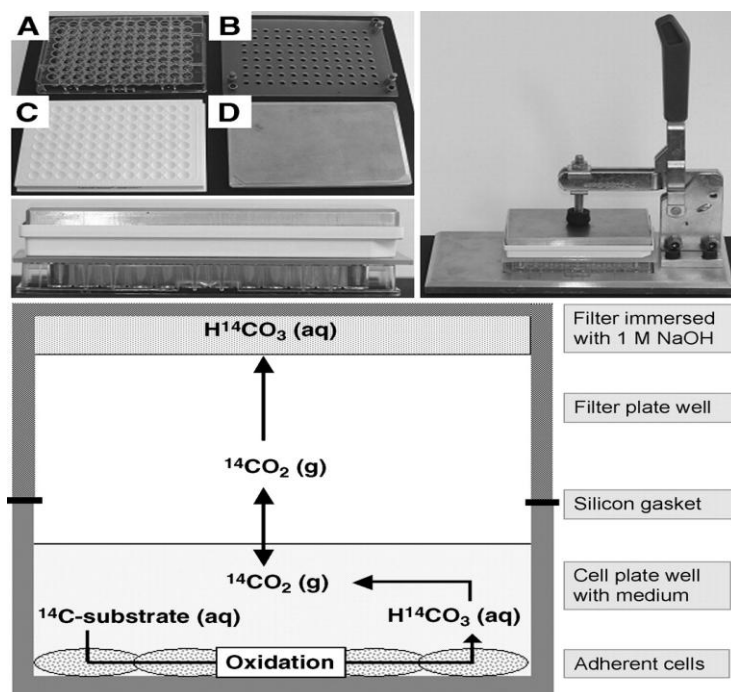
Etter at satelittceller ble sådd ut i riktig mengde i forhold til størrelsen på brønnen (tabell 1), ble de inkubert ved 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>, og vekstmedium ble skiftet hver andre eller tredje dag frem til 70-80 % konfluens. Deretter ble vekstmedium byttet ut med differensieringsmedium (vedlegg 6.1.3), noe som gjorde at cellene sluttet å dele seg, og i stedet differensierte fra encellede myoblaste til flerkjernede myotuber som ble brukt til forsøk.

## 2.3 Substratoksidasjonsforsøk

Ved hjelp av substratoksidasjonsmetoden, som er beskrevet av Wensaas et al. [50], kan man detektere oksidasjon av <sup>14</sup>C merkede substrater. I denne oppgaven ble metoden benyttet til å studere opptak og oksidasjon av oljesyre og glukose i myotuber fra *PLIN2-KO* og *PLIN2-WT* mus. Metoden går ut på å trappe <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> som produseres av cellene i løpet av 4 timers inkubering. Cellene sås ut på et 96-brønners NUNC Brett med flat bunn, prolifereres og differensieres. På dag 2 av differensieringen ble noen av cellene behandlet med 10 nM

GW501516 ved å tilsette dette til inkubasjonsmediet, før selve forsøket utføres på differensieringsdag 4. For å kunne studere både oljesyreoksidasjon og glukoseoksidasjon ble det utført et overkrysningsforsøk. Halve brettet ble tilsatt medium med 100  $\mu\text{M}$  [1- $^{14}\text{C}$ ]oljesyre  $\pm$  1  $\mu\text{M}$  FCCP, mens andre halvdel av samme brett ble tilsatt medium med 100  $\mu\text{M}$  D-[ $^{14}\text{C}$ (U)]glukose  $\pm$  1  $\mu\text{M}$  FCCP (vedlegg 6.4). I tillegg ble noen av brønnene med [1- $^{14}\text{C}$ ]oljesyre tilsatt 100  $\mu\text{M}$  kald (umerket) glukose, og noen av brønnene med D-[ $^{14}\text{C}$ (U)]glukose ble tilsatt 100  $\mu\text{M}$  kald oljesyre, for å se på hvordan dette gjensidig ville påvirke oksidasjonen.

For å fange opp  $\text{CO}_2$  som oksideres brukes en 96-brønners filterplate (Unifilter<sup>®</sup> GF/B) som fuktes med 20  $\mu\text{l}$  1 M NaOH og klemmes fast over brettet med celler i en lufttett sandwich (silikonmembran imellom), etter tilsetningen av  $^{14}\text{C}$  merkede substrater. Apparatet monteres som vist i figur 7, og hele apparatet plasseres i en inkubator i 4 timer. Oksidasjon ( $\text{CO}_2$ ) fra myotubene vil fanges av NaOH i filterplaten, og kan leses av i en  $\beta$ -scintillatorteller etter inkubering. Mengde radioaktivitet som registreres vil tilsvare mengde oksidert [1- $^{14}\text{C}$ ]oljesyre eller D-[ $^{14}\text{C}$ (U)]glukose i cellene.



**Figur 7: Apparatoppsett og prinsipp for substratoksidasjonsforsøk.** Oppsettet består av et 96-brønners cellebrett (A), en silikonmatte (B) som festes til cellebrettet med fire plugger, en filterplate (C) som plasseres opp ned over cellebrettet og silikonmatten, før en tykk metallplate (D) legges på toppen og klemmes fast ved hjelp av selve trappeapparatet. Denne sandwichen er lufttett, og  $\text{CO}_2$  som frigjøres når  $^{14}\text{C}$  substratet oksideres i mitokondriene i cellene fanges opp av NaOH i filterplaten. Hentet fra [50].

Etter inkubering demonteres oppsettet, og filterplaten tilsettes 40 µl OptiphasSupermix<sup>®</sup> per brønn før den dekkes til med TopSeal<sup>®</sup>-A gjennomsiktig plastfilm. Etter inkubering i minst to døgn måles radioaktiviteten med 1450 Microbeta PLUS<sup>®</sup> fra Wallac (PerkinElmer).

Trappemediet suges av og kastes, før cellene vaskes to ganger med 150 µM 1 x høstebuffer (PBS)(vedlegg 6.3.1), lyses med 150 µl 0,1 M NaOH og fryses ved -20 °C.

### 2.3.1 Forbehandling med radioaktiv oljesyre

Substratoksidasjonsforsøket ble også utført ved å merke cellene med 100 µM og 400 µM [1-<sup>14</sup>C]oljesyre 24 timer før selve trappingen, ved å tilsette oljesyre i differensieringsmediet på differensierings-dag 3. På denne måten er det oljesyre som er lagret i cellene fra før som oksideres. Før forsøket ble det radioaktive mediet fjernet og cellene vasket med 2x50 µl 0,5 % BSA løst i HBSS eller DPBS med Ca<sup>2+</sup> og Mg<sup>2+</sup>, for å fjerne all radioaktivitet. Cellene ble så tilsatt trappemedium (vedlegg 6.3.2) uten noen tilsetninger, eller ble behandlet akutt med 10 µM salbutamol, 100 µM kald (umerket) oljesyre eller 100 µM glukose i tillegg til formerkingen. Halvparten av cellene fikk også 1 µM FCCP tilsatt, før cellebrettet ble plassert i trappeapparatet og inkubert i 4 timer som beskrevet over. Filterplaten telles i β-scintillasjonstelleren, og cellene høstes ved å tilsette 150 µl 0,1 M NaOH og fryses ved -20 °C.

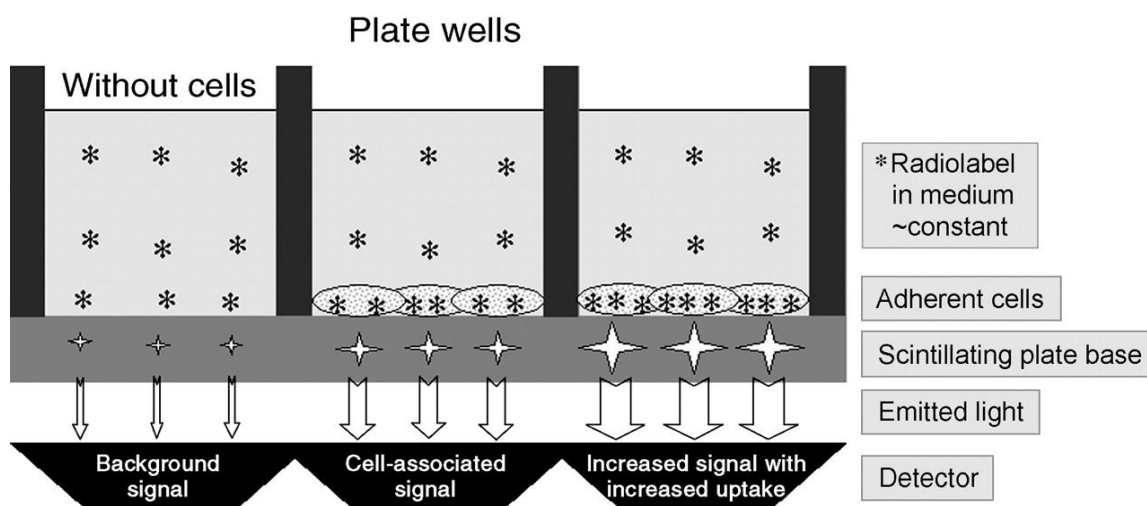
### 2.3.2 Måling av celleassosiert radioaktiv oljesyre og glukose

I tillegg til oksidasjon er det interessant å undersøke hvor mye [1-<sup>14</sup>C]oljesyre eller D-[<sup>14</sup>C(U)]glukose som har blitt akkumulert i cellene i løpet av inkubasjonen, for å se om det er noen forskjell på lagringskapasiteten mellom de to ulike celletypene. Dette kalles celleassosiert radioaktivitet (CA), og ved å legge sammen mengde substrat som ble oksidert med mengde substrat som er igjen i cellene, får man et mål på hvor mye som ble tatt opp og omsatt totalt i cellene under forsøket.

Cellebrettet tines i varmeskap og 50 µl homogenisert cellelysat fra hver brønn overføres til en 96 brønners Isoplate, som så tilsettes 100 µl OptiphasSupermix<sup>®</sup> per brønn før den dekkes til med TopSeal<sup>®</sup>-A gjennomsiktig plastfilm. Etter 2 timers henstand ved romtemperatur telles platen med 1450 Microbeta PLUS<sup>®</sup>, og mengden radioaktivitet som registreres vil være proporsjonal med mengde som er akkumulert i cellene under oksidasjonsforsøket.

## 2.4 Scintillation proximity assay (SPA)

SPA (scintillation proximity assay) er en metode som gjør at man kan måle både akkumulering og lipolyse av radiomerkede substrater i samme forsøk, og ble brukt for å studere forskjeller mellom *PLIN2-WT* og *PLIN2-KO* myotuber med tanke på akkumulering og lipolyse av oljesyre over lengre tid. Det benyttes en spesiell type 96-brønners plate, Scintiplate® 96 TC, som har en scintillator base under hver brønn. Siden scintillatoren er lokalisert på denne måten, vil radioaktivt merket oljesyre som akkumuleres i adherente celler gi et sterkere lyssignal til detektoren enn oljesyre i cellemediet. Influx av [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ]oljesyre i cellene gir altså et sterkere signal, da radioaktiviteten befinner seg nærmere scintillatoren. Etter at cellene har blitt vasket og [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ]oljesyre fjernet fra mediet, vil signalet bli svakere, da [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ]oljesyre som befinner seg inne i cellene (mye befinner seg i komplekse lipider) vil forsvinne ved oksidering eller lipolyse (Figur 8).



**Figur 8: Prinsipp for SPA.** Når cellene tar opp radioaktivt merket oljesyre, vil denne befinne seg nærmere detektoren, og signalet blir sterkere enn det ville vært om oljesyren hadde vært løst i mediet. Jo mer oljesyre som tas opp, jo sterkere blir signalet. Hentet fra [50].

Cellene ble sådd ut og differensiert i 4 dager på Scintiplate®-96 TC. Forsøksdagen ble differensieringsmediet fjernet og erstattet med 50 µl «pulsmedium» (vedlegg 6.5.1) per brønn, med ulik konsentrasjon oljesyre tilsatt. For å måle oljesyreopptaket ved tid 0 ble platen satt til telling i MicroBeta umiddelbart etter tilsetningen. Senere målinger ble siden relatert til tid 0. Akkumuleringen av oljesyre ble så målt hver 2. time frem til 8 timer, og igjen etter 24 timer. Etter 24 timer ble cellene vasket med 2x50 µl 0,5 % BSA løst i HBSS eller DPBS med  $\text{Ca}^{2+}$  og  $\text{Mg}^{2+}$ . Etter vask ble cellene tilsatt «chasemedium» (vedlegg 6.5.3)  $\pm 1$  µM triacsin C, 50

µl per brønn, og målt hver 2. time fra tid 0 til 6 timer. Etter siste telling ble cellene vasket med 150 µl PBS og lysert med 150 µl 0,1 M NaOH, før de ble frosset ved -20 °C.

## 2.5 Proteinmåling (Bradford metoden)

Forsøk hvor radioaktivitet måles for å se på for eksempel cellenes evne til å oksidere fettsyrer, må relateres til antall celler som befinner seg i hver brønn. Da det ikke er mulig å telle antall celler, gjøres dette ved å måle mengde protein som befinner seg i brønnen etter at cellene er blitt lysert. Resultatet av forsøket kan dermed fremstilles mer realistisk ved å beregne nmol/mg celleprotein. For å måle mengde protein i hver brønn, ble Bradford metoden anvendt. Denne metoden baserer seg på fargestoffet Coomassie Brilliant Blue G-250, som har den egenskapen at binding av proteiner til denne gjør at absorpsjonsmaksimum endres fra 465 nm til 595 nm. Konsekvensen av dette er en fargeendring fra rød til blå, og ut fra intensiteten av blåfargen kan man estimere mengde protein i prøven ved hjelp av en standardkurve. Endringen i absorbans detekteres av et spektrofotometer [51].

Brettet med lyserte celler tines i inkubatorskapet ved 37 °C i ca. 2 timer. Etter dette homogeniseres cellene og prøven overføres, 50 µl fra hver brønn, til et 96-brønners NUNC brett med flat bunn. Det er på forhånd laget standardløsninger av BSA fortynnet i 0,1 M NaOH i ulike konsentrasjoner, som tilsettes de to første radene på brettet (0-160 µg/ml). Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate fortynnet 1:5 i dH<sub>2</sub>O ble tilsatt, 200 µl/brønn. Det er viktig å unngå luftbobler, da disse vil kunne påvirke resultatet. Biorad endrer farge fra rød til blå, og jo kraftigere blåfargen er, jo mer protein er til stede. Bindingen skjer raskt, og 5 minutter etter tilsetning måles absorbansen med Wallac Victor<sup>TM</sup> mikroplateleser (PerkinElmer).

## 2.6 Analyse av syreløselige metabolitter (ASM)

Fra SPA og substratoksidasjons-forsøkene ble det tatt ut 30 µl av inkubasjonsmediet fra hver brønn og overført til et 96 brønners NUNC brett med spiss bunn. Dette ble lagret ved -20 °C, og senere brukt til analyse av syreløselige metabolitter (ASM), som er et mål på β-oksidering av fettsyrer. Etter at prøver fra flere forsøk er samlet opp, tines brettene i varmeskap før 100 µl 1 M HClO<sub>4</sub> og 10 µl 6 % BSA tilsettes. Dette gjør at BSA-fettsyre/lipid komplekser felles ut, og brettene sentrifugeres ved 2100 g i 10 minutter ved 4 °C. Dette gjør at bunnfallet samler

seg som en pellet i den spisse enden av brønnen, og det at det sentrifugeres kaldt gjør at denne ikke så lett løser seg opp igjen. 30 µl av supernatanten ble så forsiktig tatt ut med multikanalpipette og over til en scintillasjonsplate. 150 µl tellervæske ble tilsatt, brettet forseglet med TopSeal®-A gjennomsiktig plastfilm og inkuberes i romtemperatur i minimum 1 time før de ble talt i 1450 Microbeta PLUS® fra Wallac (ved bruk av telleprotokollen for lysat/asm).

## 2.7 Lipidfiltrering

Noen av brettene med cellelysat fra SPA forsøk ble også brukt til lipidfiltrasjon. Under lipidfiltrasjon vil lipider som har akkumulert i cellene bindes til en hydrofob membran, og ved å telle mengde radioaktivitet får man et bilde på hvor mye lipider som har akkumulert i cellene.

Platene med cellelysat tines i varmeskap. For å fukte filteret som brukes til filtrasjonen tilsettes 75 µl 70 % etanol til Multiscreen®HTS filterplater. Etter 30 sekunder filtreres etanolen gjennom filteret ved hjelp av en Millipore vakuumbastasjon. Det er viktig at filteret ikke tørker før forsøket er ferdig. Filteret vaskes med 2 x 200 µl destillert vann, og overflødig vann fjernes før 50 µl prøve fra hver brønn tilsettes og filtreres. Etter filtrasjonen vaskes filteret med 6 x 100 µl destillert vann. Igjen fjernes overflødig vann, og plastfilmen på undersiden av brettet byttes ut med TopSeal før 100 µl OptiphasSupermix® per brønn tilsettes og brettet dekket til med TopSeal®-A gjennomsiktig plastfilm. Etter 1 timers inkubering ved romtemperatur telles brettet med 1450 Microbeta PLUS®.

## 2.8 Real-time qPCR

Tidligere resultater har vist at PLIN2 genet var tilstede i celler fra både *PLIN2-KO* og *PLIN2-WT* mus. For å undersøke dette nærmere, og for å finne ut hvilke celler som burde brukes videre, ble det utført kvantitativ real-time polymerasekjedereaksjon (qPCR). Denne metoden ble benyttet på celler fra disse musene samt celler som nylig var blitt rensset opp, for å undersøke om genet som koder for PLIN2 var tilstede eller ikke.

Celler ble sådd ut på 25 cm<sup>2</sup> NUNC flasker coatet med 2 % Matrigel fortynning, 2 flasker per donor. Cellene ble proliferert og differensiert til myotuber som tidligere beskrevet før en av

flaskene for hver donor ble tilsatt 100  $\mu$ M OA i 24 timer. Cellene ble skylt med 2x2 ml PBS-buffer uten  $\text{Ca}^{2+}$  og  $\text{Mg}^{2+}$ , og lysert med 500  $\mu$ l lysis buffer tilsatt  $\beta$ -ME (fra Agilent). Flaskene ble skrapet med celledraper og lysatet ble overført til Eppendorfrør og frosset ved -80 °C for lagring.

Det var også ønskelig å undersøke om effekten av at PLIN2 var fjernet kunne påvirke uttrykket av utvalgte gener. Til dette formålet ble en litt annerledes metode benyttet, celler ble sådd ut på 12 brønners brett med Matrigel coating og differensiert i 3 dager til myotuber, før myotubene ble behandlet med 100  $\mu$ M OA i 24 timer. Den fjerde dagen ble cellene vasket med 1 ml PBS uten  $\text{Mg}^{2+}$  og  $\text{Ca}^{2+}$  per brønn, før 500  $\mu$ l nucleic acid purification lysis blandet med PBS uten  $\text{Mg}^{2+}$  og  $\text{Ca}^{2+}$  i forholdet 1:1 ble tilsatt.

### 2.8.1 Isolering av total RNA

For å isolere RNA fra celleprøvene ble Agilent total RNA isolation mini kit fra Agilent Technologies benyttet. Dette inneholder nukleasefritt vann, vaskeløsninger og flere typer minikolonner. Cellelysaten ble tint på varmeblokk, overført til hver sin mini-prefiltrasjon kolonne og sentrifuseret i 3 minutter ved 16000 x g. Dette trinnet gjør at cellene blir homogenisert og at cellulær kontaminasjon fjernes slik at store proteiner ikke skal føre til at isolasjonskolonnen tetter seg. Filterdelen kastes og filtratet tilsettes lik del 70 % etanol (500  $\mu$ l). Dette blandes godt og inkuberes ved romtemperatur i 5 minutter. Blandingen tilsettes i to omganger til mini isolasjonskolonnen, som sentrifuseres i 30 sekunder ved 16000 x g. RNA er vannløselig, men er ikke løselig i etanol. RNA vil derfor heller binde seg til filteret i isolasjonskolonnen enn å bli i etanol blandingen. Filteret skylles to ganger med 500  $\mu$ l vaskeløsning (inneholder etanol for ikke å vaske ut RNA). Filtratene kastes. Mini isolasjonskolonnen spinnes så i 2 minutter ved 16000 x g for å fjerne rester av vaskeløsningen. Filteret flyttes over i et nytt RNase-fritt Eppendorfrør, og tilsettes 20  $\mu$ l nuklease-fritt vann i midten av filteret. Filtrene hviler i 1 minutt før RNA elueres ved sentrifugering i 1 minutt ved 16000 x g. Rørene med isolert RNA settes på is for videre kvantifisering, eller lagres ved -80 °C.

RNA ble også isolert ved hjelp av instrumentet Applied Biosystem 6100. Dette instrumentet bruker samme prinsippet som over, men er bedre egnet om man har et større antall prøver. Hver prøve ble tilsatt i en 96-brønners «RNA purification tray», og prøvene ble sugd gjennom

denne ved hjelp av vakuum. RNA befinner seg nå i et filter under brettet, og blir rensset gjennom å tilsette flere runder med vaskeløsninger, som man så starter (setter på vakuum) i henhold til et forhåndsinstallert program for RNA isolering. Tilslutt elueres isolert RNA ved å tilsette 100 µl nucleic acid purification elueringsløsning, og prøvene settes på is for å hindre degradering av RNA.

## **2.8.2 Kvantifisering av RNA**

Mengde RNA i prøvene ble kvantifisert ved hjelp av to ulike apparater etter produsentens protokoller; Qubit<sup>®</sup> fluorometer fra Invitrogen og NanoDrop Lite fra Thermo scientific. Etter kvantifisering lagres RNA ved -80 °C eller brukes straks til cDNA-syntese.

### **Qubit<sup>®</sup> Fluorometer**

Quant-iT<sup>™</sup> assay skal utføres ved romtemperatur, da fluktasjoner i temperatur vil kunne påvirke resultatet. Standarder og prøvene fortynnes med Quant-iT<sup>™</sup> Working Solution, som lages ved å fortynne Quant-iT<sup>™</sup> Reagent 1:200 i Quant-iT<sup>™</sup> Buffer. Spesielle Qubit<sup>®</sup> assay rør brukes til å fortynne standarder og prøver til totalt 200 µl, hvor 10 µl standard og 1-20 µl prøve tilsettes. Det kan bli nødvendig å fortynne prøvene ytterligere med Working Solution dersom konsentrasjonen er for høy til å leses av. Rørene spinnes i 2-3 sekunder og inkuberes ved romtemperatur i 2 minutter før de settes inn i fluorometeret og leses av. Qubit<sup>®</sup> fluorometer må først kalibreres med standardene, før man leser av prøvene.

### **NanoDrop Lite og NanoDrop 1000**

NanoDrop Lite og NanoDrop 1000 spektrofotometere brukes ved å først kalibrere apparatet ved å tilsette 1 µl nuklease fritt vann (blanken - det samme som ble brukt til å eluere RNA), på den optiske linsen. Væsken blir dratt mellom de to overflatene, og målingen skjer gjennom dråpen. Mellom hver måling tørkes dråpen av med en tørr klut/papir. Etter homogenisering ved å pipettere opp og ned måles prøvene på samme måte, og resultatet leses av på skjermen.

## **2.8.3 cDNA syntese**

Dobbeltrådet cDNA syntetiseres fra enkeltrådet RNA ved hjelp av enzymet revers transkriptase. cDNA brukes videre som templat for PCR amplifisering.



Konsentrasjonene av RNA fra kvantifiseringen ble brukt til å finne volumet av prøve som tilsvarer 2 µg RNA. Riktig volum ble overført til mini Eppendorfrør og tilsatt destillert vann til 13,2 µl. En reaksjons miks fra High Capacity cDNA Reverse Transcription kit fra ABI ble laget etter følgende oppskrift (tabell 2, kolonne nr. 1):

**Tabell 2: cDNA Reverse Transcription kit oppskrift.**

Reagens	Pr. prøve volum (µl), 1	Pr. prøve volum (µl), 2
DEPC-dH <sub>2</sub> O + prøve	13,2	13,0
RNase-fritt vann	-	1,2
10 x TaqMan RT buffer	2,0	2,0
25 x dNTP mix	0,8	0,8
10 x RT Random hexamers	2,0	2,0
RNase inhibitor (20U/µl)	1,0	-
Multiscribe Reverse Transcriptase (50 U/µl)	1,0	1,0
Total	20 µl per tube	21 µl per tube

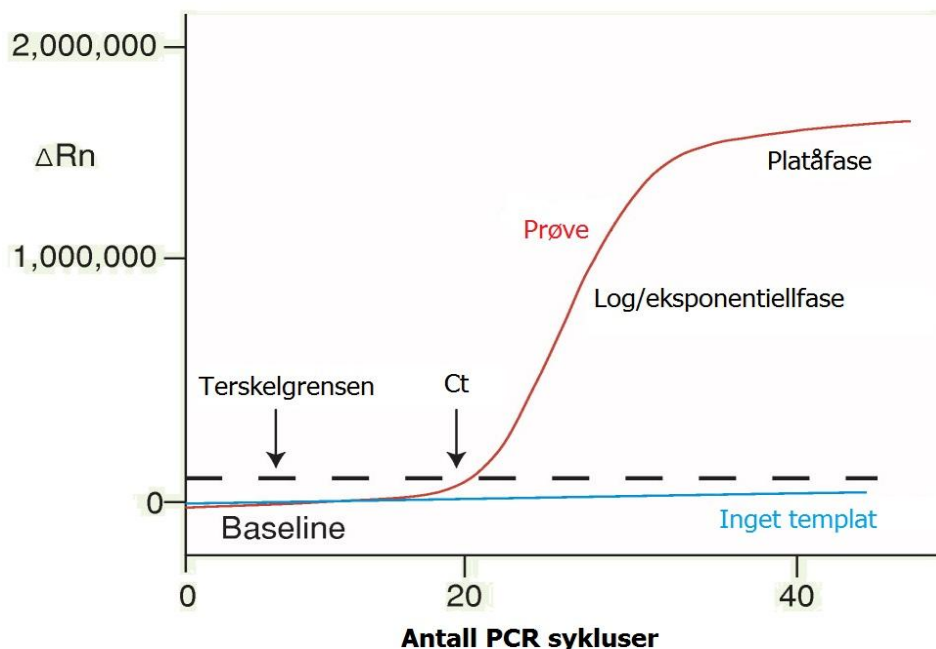
6,8 µl av reaction mix ble tilsatt hvert rør. Revers transkripsjon fra mRNA til cDNA ble utført med GeneAmp PCR System 9700 fra Applied Biosystems. 10 minutter ved 25 °C (hexamer/template priming), 80 minutter ved 37 °C (revers transkriptase), og 5 minutter ved 85 °C (inaktivering av revers transkriptase).

En reaksjonsmiks fra High Capacity cDNA Reverse Transcription kit fra ABI ble laget på nesten same måte som før (tabell 2, kolonne nr. 2), men en prøve ble tatt ut fra miksen før enzymet ble tilsatt. Riktig volum RNA prøve tilsvarende 200 ng ble tatt ut og fortynnet med vann til riktig konsentrasjon og et totalvolum på 13 µl. I tillegg ble det laget en prøve som kun besto av vann, og en prøve med en blanding av RNA fra alle tre donorene som ikke ble tilsatt enzym. 7 µl fra master-mix ble tilsatt hver brønn, slik at hvert rør fikk et totalvolum på 20 µl.

Selve syntesen av cDNA ble utført på ABI Veriti™ Thermal Cycler. 10 minutter ved 25 °C (hexamer/template priming, annealingsfase), 120 minutter ved 37 °C (revers transkriptase), og 5 sekunder ved 95 °C (inaktivering av revers transkriptase enzymet). cDNA ble så lagret ved -20 °C.

## 2.8.4 Real-time qPCR

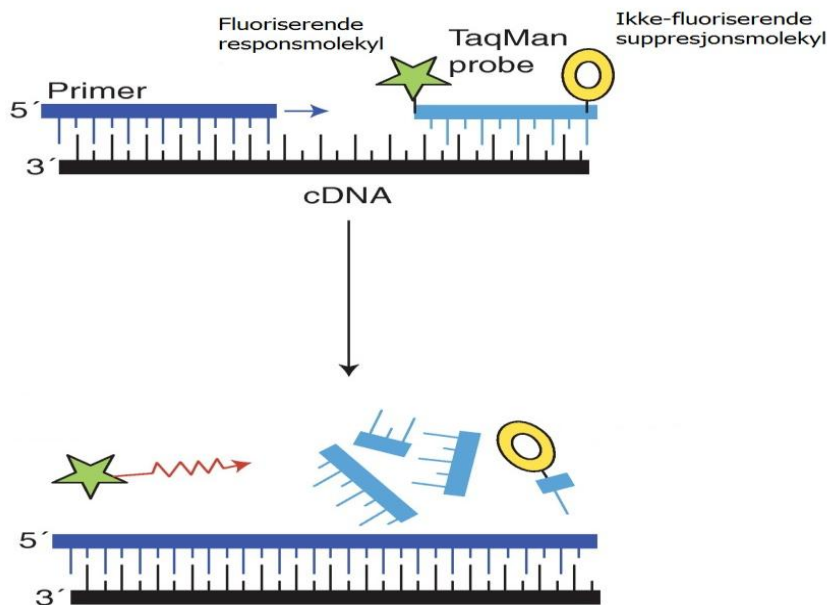
Real-time qPCR genererer kopier av et DNA templat eksponensielt, og det oppstår et kvantitativt forhold mellom mRNA (via cDNA) templatene som var til stede i utgangspunktet og mengde PCR produkt som akkumuleres. For å detektere dette brukes forskjellige fluoriserende detektorer, for eksempel en TaqMan probe eller SYBR green. Akkumuleringen skjer i tre faser. Under baseline-fasen øker mengde produkt ved hver PCR syklus, men fluorescensen er fremdeles for lav til å detekteres. Baselinjen er ofte fra syklus tre til syklus 15, men må justeres manuelt. Emisjonen fra produktet til enhver tid minus emisjonen fra baselinjen, kalt  $\Delta R_n$ , plottes mot antall sykluser. En terskelverdi beregnes ut fra baselinjen, hvor signaler over terskelverdien regnes som et ekte signal, og kan brukes til å beregne Ct-verdien. Tilstedeværelsen av en større mengde templat ved begynnelsen av en PCR reaksjon vil føre til at færre sykluser er nødvendig for å akkumulere nok produkt til å nå punktet hvor det fluorescerende signalet er signifikant høyere enn bakgrunnsstøyen. Dette punktet er Ct-verdien til produktet, og defineres som antall sykluser som må til før reporter fluorescensen er høyere enn terskelverdien. Over terskelverdien vil DNA amplifiseringen øke eksponensielt, uten begrensninger fra reaksjonsparametere, frem til platåfasen hvor hastigheten synker og grafen flater ut (Figur 9) [52].



**Figur 9: Amplifiseringsplott fra qPCR.** Akkumulering av DNA produkter fra et templat vil først registreres når det kommer over en terskelgrense. Antall sykluser som har gått når terskelgrensen nås kalles Ct-verdien. Fra dette punktet øker mengde DNA produkt eksponensielt, før det når en platåfase hvor amplifiseringen flater ut. Modifisert fra [52]

## TaqMan

TaqMan proben er et oligonukleotid som er komplementær med målsekvensen vi ønsker å kvantifisere. Den har et fluoriserende respsmolekyl bundet til 5'-enden og et ikke-fluoriserende suppressjonsmolekyl bundet til 3'-enden. Så lenge proben forblir intakt og bundet til DNA templatet, vil respsmolekylets fluorescens bli absorbert av suppressjonsmolekylet via «fluorescence resonance energy transfer» (FRET) prinsippet. Etter hvert som det termostabile enzymet *Thermus aquaticus* (Taq) DNA polymerase utvider primeren, blir proben kløyyvet i små biter ved enzymets 5' exonuklease aktivitet, og respsmolekylet separeres fra suppressjonsmolekylet. Etter som respsmolekylet ikke lenger hemmes, vil emisjonen øke ved degradering av proben. Ytterligere prober blir kløyyvet ved hver syklus, uten å interferere med akkumuleringen av PCR produkt, og økningen av fluorescens signalets intensitet vil være proporsjonal med mengde DNA som syntetiseres (Figur 10).



**Figur 10: TaqMan assay ved qPCR.** Så lenge TaqMan proben forblir intakt, vil emisjon fra respsmolekylet hemmes av suppressjonsmolekylet. Først ved binding av primer som kløyyver proben, vil det kunne registreres fluorescens signal fra denne. Modifisert fra [52].

Det ble kjørt real-time qPCR på diverse gener som er viktige for energimetabolismen (vedlegg 6.7.2) ved hjelp av TaqMan metoden. cDNA prøvene, 2x TaqMan® Universal PCR Mastermix og Taqman® Gene Expression Assays tines på is, før disse ble blandet som beskrevet i tabell 3.

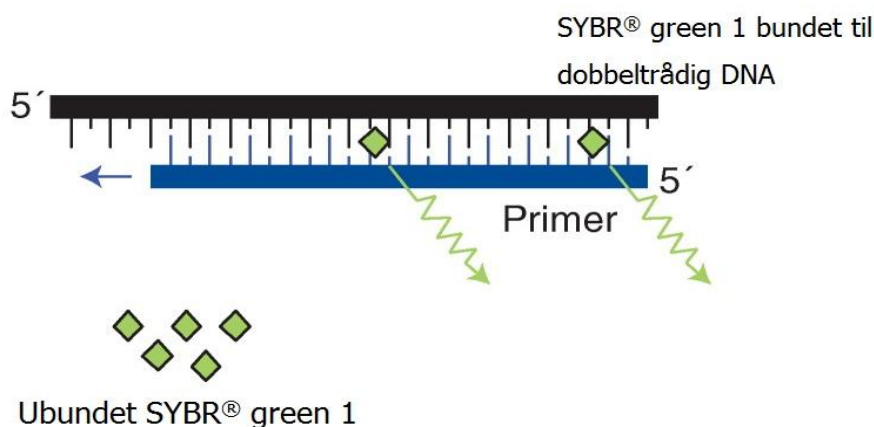
**Tabell 3: Blanding av 2x TaqMan® Universal PCR Mastermix, PCR vann, TaqMan® Gene Expression Assay og cDNA (2 ng/μl) per brønn.**

Reagens	Volum (μl)
PCR vann	4
2x TaqMan® Universal PCR Mastermix	10
Taqman® Gene Expression Assay	1
cDNA (5x fortynnet)	5

Miksen, bortsett fra cDNA, blandes og pipetteres over til ABI Prism® 96-Well Optical Reaction Plate, 15 μl per brønn. Det lages én miks per primer. cDNA fortynnes 5 ganger med RNase-fritt vann til en konsentrasjon på 2 ng/μl, før 5 μl fra hver prøve overføres til platene. Etter alt er tilsatt, forsegles platene med ABI Prism® Optical Adhesive sealing, som festes veldig godt rundt hver enkelt brønn for å forsikre at ikke prøvene fordamper under PCR reaksjonen. Prøvene i platene blandes godt og spinnnes ned i ett minutt ved 1000 rpm, før de settes inn i ABI 7900HT maskinen. Riktige innstillinger velges, og reaksjonen settes i gang.

### **Sybr green**

En annen detektor som ble brukt i denne oppgaven for å måle mengde DNA produkt som akkumuleres under PCR reaksjonen er SYBR green 1. SYBR® green 1 er et molekyl som interkalierer i dtDNA (dobbeltrådig DNA) strukturen. Molekylet avgir lite fluorescens så lenge det er ubundet i løsning, mens bundet til dtDNA sender det ut et sterkt signal. Økningen i fluoresens brukes derfor for å monitorere økende mengde amplifisert DNA under PCR reaksjonen. Reaksjonen er ikke spesifikk for en bestemt sekvens da SYBR green 1 vil binde til all dtDNA som er tilstede (også primer-dimere), men fordelene er at den kan brukes med hvilket som helst primer par på hvilket som helst target, noe som gjør metoden er relativt billig (Figur 11).



**Figur 11: SYBR green 1.** SYBR green 1 vil kun avgi emisjon når det er bundet til doppeltrådig DNA produkt som dannes i PCR reaksjonen.

SYBR green metoden ble benyttet for å undersøke om PLIN2 genet faktisk er borte i *PLIN2-KO* myotuber, mens det fremdeles er tilstede hos *PLIN2-WT* myotuber. Dette er viktig å vite sikkert for videre forsøk. For å kunne relatere mengde DNA produkt som produseres til mengde templat, lages det en standardkurve av kjente konsentrasjoner cDNA mix. Det ble så laget en SYBR green PCR-mix for hvert primersett etter følgende oppskrift:

**Tabell 4: SYBR green PCR-mix.**

Reagens	Volum per prøve (µl)
2 x mix	12,5
Primer F 30 µM	0,25
Primer R 30 µM	0,25
DEPC-dH <sub>2</sub> O	9,5
Total	22,5

22,5 µl SYBR green mix og 2,5 µl standard eller prøve tilsettes brønnene på en MicroAmp<sup>®</sup> Optical 96-brønners plate, tre brønner for hver standard konsentrasjon og 2 brønner for hver prøve. Dette ble gjort for både PLIN2 og β-aktin. I tillegg settes en negativ kontroll (NTC) bestående av 22,5 µl SYBR green mix og 2,5 µl vann i en av brønnene. Etter at MicroAmp<sup>™</sup>

Optical Adhesive Film plastfilm er klistret godt på settes platen inn i ABI PRISM<sup>®</sup> 7000 fra Applied Biosystems, og programmet startes.

## 2.9 Live cell imaging

For å undersøke om det er noen forskjell i mengde og størrelse av lipiddråper i *PLIN2-KO* myotuber i forhold til *PLIN2-WT* myotuber, ble det utført farging av cellene og påfølgende live cell imaging. Cellene ble sådd ut på 24-brønners brett med glassbunn (Mattek Corporation), proliferert og differensiert i 4 dager. Det ble tilsatt forbehandling med enten 0  $\mu$ M, 100  $\mu$ M eller 400  $\mu$ M OA 24 timer før forsøket. En av brønnene ble også behandlet med 1  $\mu$ M FCCP noen timer før forsøk. Forsøksdagen (dag 4) ble cellene farget med Hoechst 33258, BODIPY og MitoTracker Red FM<sup>®</sup>. Hoechst akkumuleres i cellekjernene (DNAet) og eksiterer blå farge (352/461 nm), Bodipy akkumuleres i lipiddråper og eksiterer grønn farge (493/503 nm) og MitoTracker akkumuleres i mitokondriene og eksiterer rød farge (581/644 nm). Fargingen utføres ved å tilsette fortynninger av fargestoffene, Bodipy løses i 100 % etanol og fortynnes i 150 mM sterilfiltrert NaCl til endelig konsentrasjon 2  $\mu$ g/ml, MitoTracker løses i DMSO til 1 mM og fortynnes i differensieringsmedium til 100 nM, mens Hoechst løses i DMSO til 100 mg/ml og fortynnes i sterilfiltrert PBST-BSA (vedlegg 6.6.1) til endelig konsentrasjon 2,5  $\mu$ g/ml. Fargestoffene tilsettes deretter til cellene én og én og mellom hver farge skylles brønnene med 150  $\mu$ l PBS. Bodipy inkuberes i 10 minutter, MitoTracker og Hoechst i 15 minutter hver. Etter farging skylles cellene en siste gang før de tilsettes colorless (fargeløst) medium (vedlegg 6.5.2), som holder cellene i live under mikroskoperingen samtidig som det ikke interfererer med fargingen. Selve mikroskoperingen gjennomføres ved hjelp av en automatisert Olympus Scan<sup>^</sup>R platform (ved bruk av et Olympus IX81 invertert fluorescens mikroskop). Det ble tatt 25 bilder per brønn, på forskjellige lokasjoner i brønnen. For hvert forsøk var der 2-4 brønner pr behandling pr donor. Hvert bilde består av 12 bilder i z retning, med 1  $\mu$ m mellomrom, som legges oppå hverandre i en projeksjon og dette bildet benyttes videre i analysen. Bildene ble analysert i Scan<sup>^</sup>R analysis software ved å først gå gjennom bildene i forhold til ulike kriterier (antall kjerner, fargeintensitet ol.) for å fjerne uteliggere og analysen ble satt i gang.

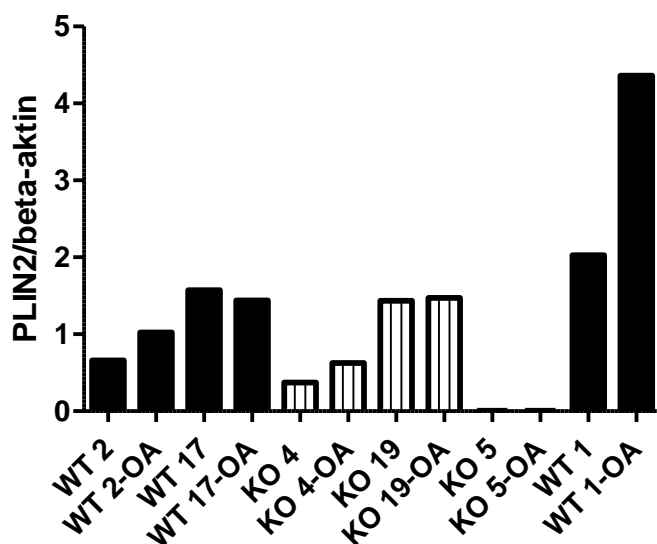
## 2.10 Statistiske analyser

I denne oppgaven vil data bli presentert som gjennomsnitt  $\pm$  standardfeil (SEM). For glukosemetabolisme og oljesyremetabolisme forsøk ved hjelp av substratoksidasjonsmetoden varierer antall forsøk (n) fra 2-3 for hver donator (*PLIN2-KO* og *PLIN2-WT*). Hvert forsøk bestod av minst 8 paralleller for basaloksidasjon, samt 4-8 paralleller for de ulike behandlingene. For å se på overordnede forskjeller i oksidasjon og opptak av oljesyre og glukose, ble alle de ulike forbehandlingene for hver donator slått sammen, og statistikk utført ved hjelp av statistikkprogramvaren SPSS og linear mixed model (lineær blandet modell, LMM). Effekten av ulike forbehandlingene innen samme donator ble vurdert ved hjelp av tosidig paret t-test mot basal, og tosidig uparet t-test for å sammenligne *PLIN2-KO* myotuber med *PLIN2-WT* myotuber, testene ble gjennomført i GraphPad Prism 5. For SPA metoden ble det utført 2 forsøk per donortype (n=2), med 8-16 paralleller per oljesyre konsentrasjon. For substratoksidasjonsforsøk med formerking av myotubene med radioaktiv oljesyre, ble det kun utført ett forsøk per donator (n=1), hvert forsøk med 8 paralleller per konsentrasjon av oljesyre, i tillegg til 4 paralleller for hver av behandlingene. Også her ble SPSS med LMM benyttet for å se på overordnede forskjeller, mens tosidig uparet t-test ble brukt for å sammenligne forskjeller mellom *PLIN2-KO* myotuber og *PLIN2-WT* myotuber innen hver behandling. Signifikansnivå benyttet i denne oppgaven var  $p \leq 0,05$ .

## 3 Resultater

### 3.1 Identifisering av *PLIN2-KO* myotuber ved qPCR

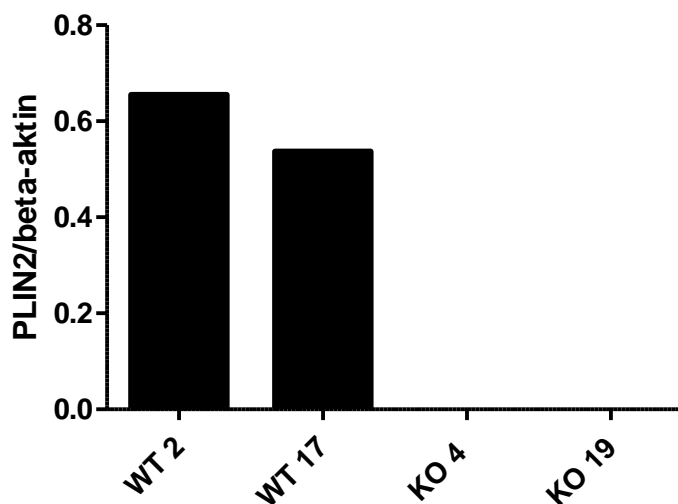
Opprensede celler fra flere forskjellige donorer ble sådd ut og differensiert på 25 cm<sup>2</sup> NUNC celleflasker til qPCR forsøk. Noen av cellene ble forbehandlet med 100 µM oljesyre (OA) i 24 timer før høsting. Hensikten med dette forsøket var å kontrollere og identifisere hvilke celler som faktisk var *PLIN2-KO* eller *PLIN2-WT* celler for videre bruk. Cellene ble undersøkt for genene *PLIN2* og  $\beta$ -aktin, der den siste fungerte som en endogen kontroll.



**Figur 12: Uttrykk av *PLIN2* i myotuber fra *PLIN2-WT* og *PLIN2-KO* mus.** Figuren viser uttrykket av *PLIN2* mRNA hos de ulike donorene  $\pm$  24 timers forbehandling med 100 µM OA, relatert til  $\beta$ -aktin.

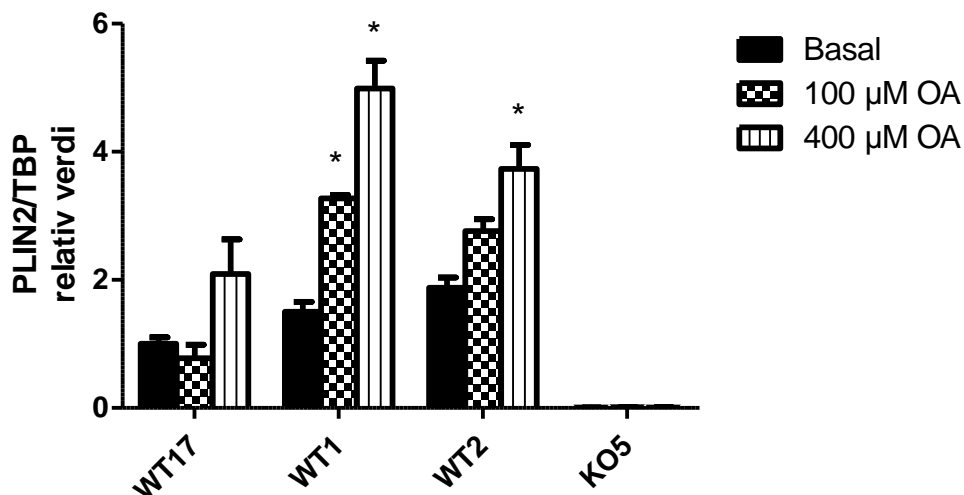
Alle cellene med unntak av *PLIN2-KO5* viste uttrykk av *PLIN2* genet (figur 12). I tillegg førte forbehandling med OA til oppregulering av *PLIN2* proteinet hos flere av donorene, hvor den største responsen ble observert i *PLIN2-WT1* myotuber. For å undersøke om tilstedeværelsen av *PLIN2* i *PLIN2-KO* myotuber er noe som har oppstått etter hvert eller om det er genet i musen som ikke var blitt knokket ut for donor nr. 4 og nr. 19, ble det også tatt opp urensede celler fra cellebanken fra tidlige passasjer, og qPCR ble utført på nytt for disse cellene på samme måte som før.





**Figur 13: Uttrykk av PLIN2 i *PLIN2*-WT og *PLIN2*-KO myotuber fra tidlige cellepassasjer.** Figuren viser uttrykket av PLIN2 mRNA hos de ulike donorene, relatert til  $\beta$ -aktin.

Resultatene fra qPCR for tidlige passasjer av cellene viste at både *PLIN2*-KO4 og *PLIN2*-KO19 celler manglet genet for PLIN2 før de ble opprenset (figur 13). Om ønskelig kunne disse cellene renses opp på nytt, for å få et større antall donorer og mer sikkerhet rundt effekten på glukose- og fettsyremetabolisme av å fjerne PLIN2 proteinet. I denne oppgaven ble kun celler fra *PLIN2*-KO5 benyttet videre.

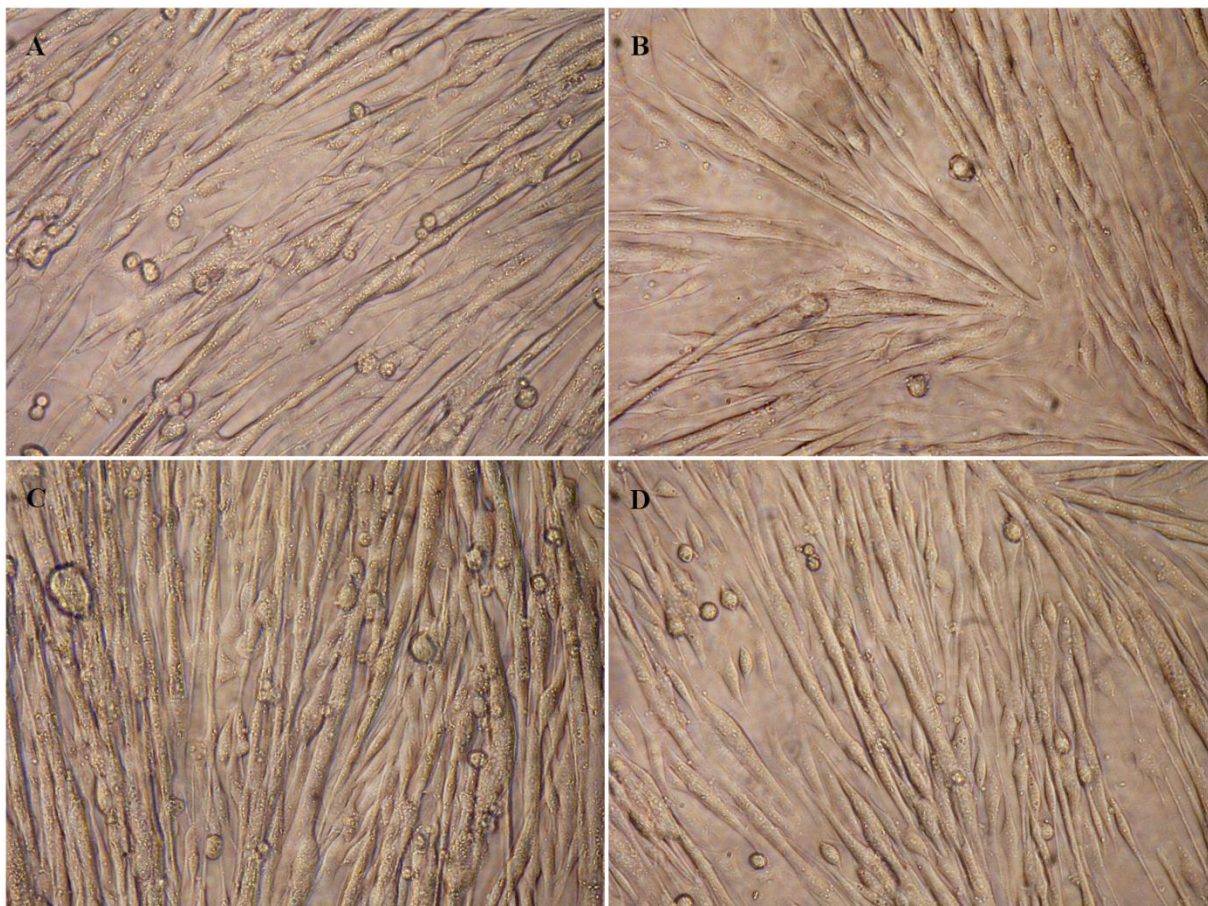


**Figur 14: Uttrykk av PLIN2 i *PLIN2*-WT og *PLIN2*-KO myotuber ved ulike konsentrasjoner av oljesyre (OA).** Figuren viser uttrykket av PLIN2 relatert til TBP (TATA box bindende protein, endogen kontroll) i myotuber fra WT17, WT1, WT2 og KO5 for basal og for 24 timers forbehandling med 100  $\mu$ M eller 400  $\mu$ M OA. Data presenteres som gjennomsnitt  $\pm$  SEM for 3 paralleller per donor,  $n=1$ . Statistiske analyser ble utført ved hjelp av tosidig paret t-test, \* $p<0,05$  mot basal.

Uttrykket av PLIN2 i de forskjellige donorene ble også undersøkt etter forbehandling i 24 timer før høsting med enten 0  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  eller 400  $\mu\text{M}$  OA (Figur 14). Uttrykket av PLIN2 økte med økende konsentrasjon OA for WT1 og WT2 donorene, men var ikke tilstede hos *PLIN2-KO5*. Uttrykk av PLIN2 var signifikant høyere for forbehandling med 100  $\mu\text{M}$  OA i WT1, samt for 400  $\mu\text{M}$  OA i WT1 og WT2 sammenlignet med uttrykket uten forbehandling ( $p < 0,05$ ) (figur 14).

## 3.2 Lagring av lipiddråper

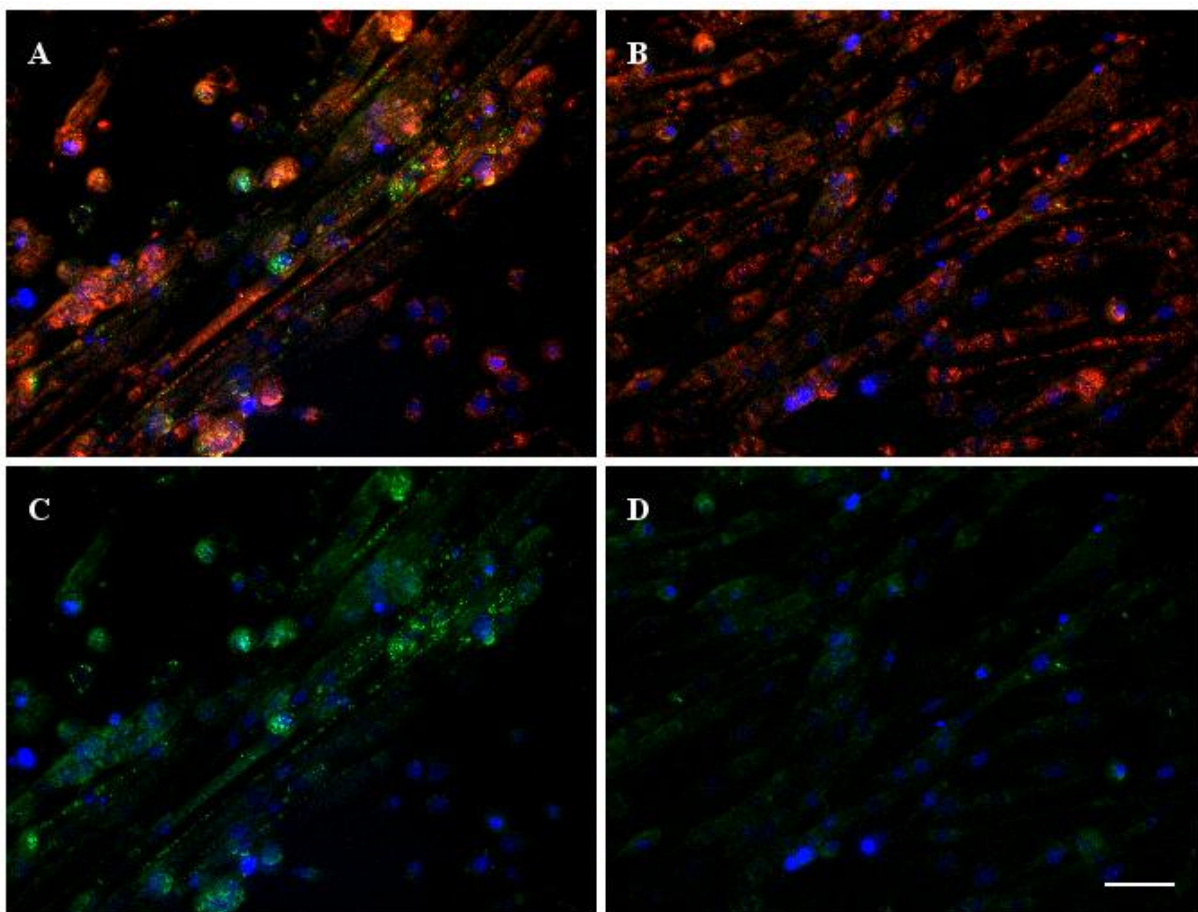
For å undersøke om det er noen forskjell på dannelsen av lipiddråper i *PLIN2-KO* myotuber sammenlignet med *PLIN2-WT* myotuber, ble det brukt mikroskop for å fotografere cellene etter 24 timers inkubering med 100  $\mu\text{M}$  og 400  $\mu\text{M}$  oljesyre (OA).



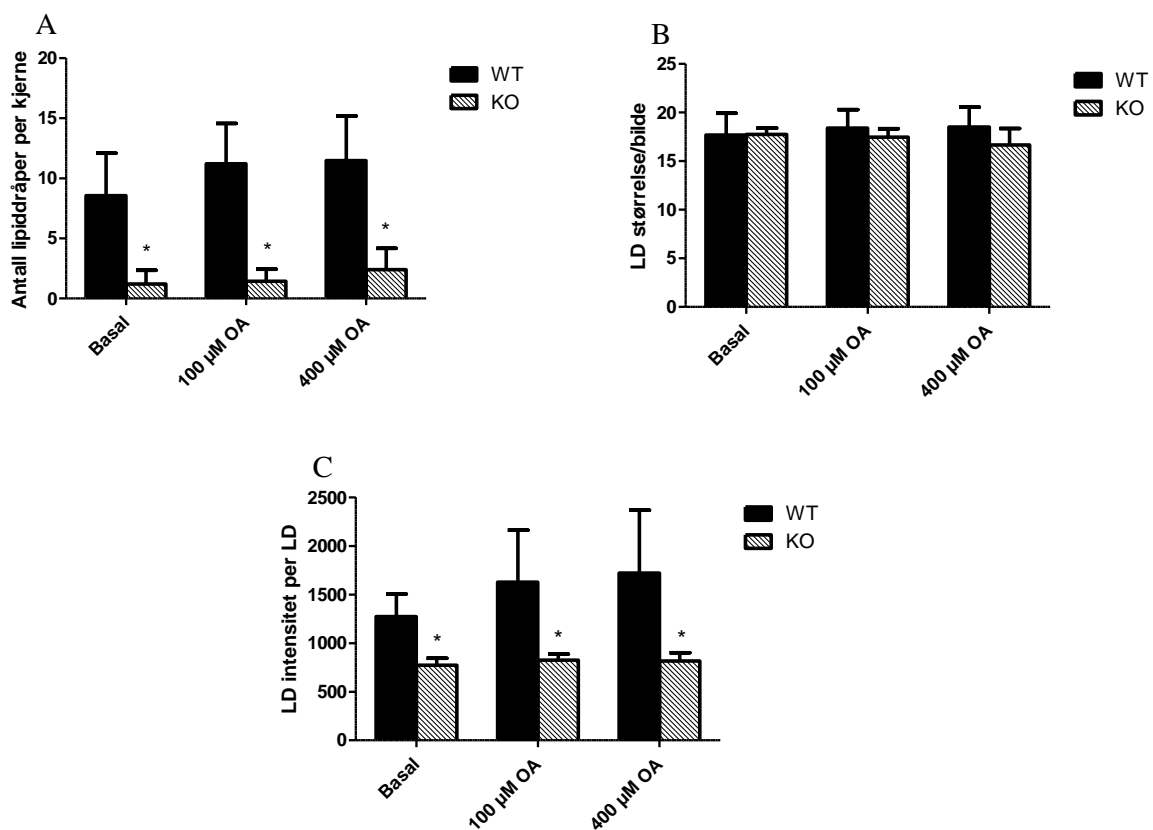
**Figur 15: Lipiddråpeakkumulering.** Lipiddråper fremtrer som små gule prikker i myotuber fra *PLIN2-WT* mus (A og C) og *PLIN2-KO* mus (B og D). Myotubene er forbehandlet med 100  $\mu\text{M}$  OA (A og B) og 400  $\mu\text{M}$  OA (C og D). Bildene er tatt ved 20x forstørrelse.

Ut fra dette forsøket kan det se ut som om det er færre lipiddråper i *PLIN2-KO* myotuber enn i *PLIN2-WT* myotuber, noe som kommer frem ved både 100  $\mu\text{M}$  og 400  $\mu\text{M}$  forbehandling med OA (figur 15).

For å kunne kvantifisere hvor stor forskjellen mellom donortypene er, og om det er forskjell på andre parametere enn antall lipiddråper, ble det utført live imaging av cellene som beskrevet under metoder. Imaging ble utført to ganger med to forskjellige villtyper (WT1 og WT2), og cellene ble inkubert i 24 timer med og uten 100  $\mu\text{M}$  OA og 400  $\mu\text{M}$  OA før farging med Hoechst, Bodipy og MitoTracker Red FM<sup>®</sup>. Imaging ble utført og bildene ble så analysert ved hjelp av Scan<sup>^</sup>R analysis software, hvor bildene ble gjennomgått ved å kvantifisere antall kjerner (blå), lipiddråper (grønne) og mengde mitokondrier (røde) (figur 16).



**Figur 16: Lipiddråpeakkumulering.** Akkumulering av lipiddråper i myotuber fra *PLIN2-WT* (A, C) og *PLIN2-KO* (B, D) etter forbehandling med 100  $\mu\text{M}$  OA i 24 timer og farging med Hoechst, Bodipy og MitoTracker Red FM<sup>®</sup>. I de to nederste bildene er rødfargen (MitoTracker) fjernet slik at forskjellen i antall lipiddråper kommer tydeligere frem. Skalabaren tilsvarer 50  $\mu\text{m}$ .



**Figur 17: Kvantifisering av lipiddråper (LD) i *PLIN2-WT* og *PLIN2-KO* myotuber.** Figuren viser forskjell i antall LD per kjerne (A), størrelsen til LD per bilde (B) og intensiteten av lipider i LD (C) mellom *PLIN2-WT* og *PLIN2-KO* myotuber. Dataene presenteres som gjennomsnitt  $\pm$  SEM,  $n=2$ . Statistiske analyser ble utført ved hjelp av tosidig uparet t-test, \* $p<0,001$  (A) og \* $p<0,05$  (C) for KO vs. WT.

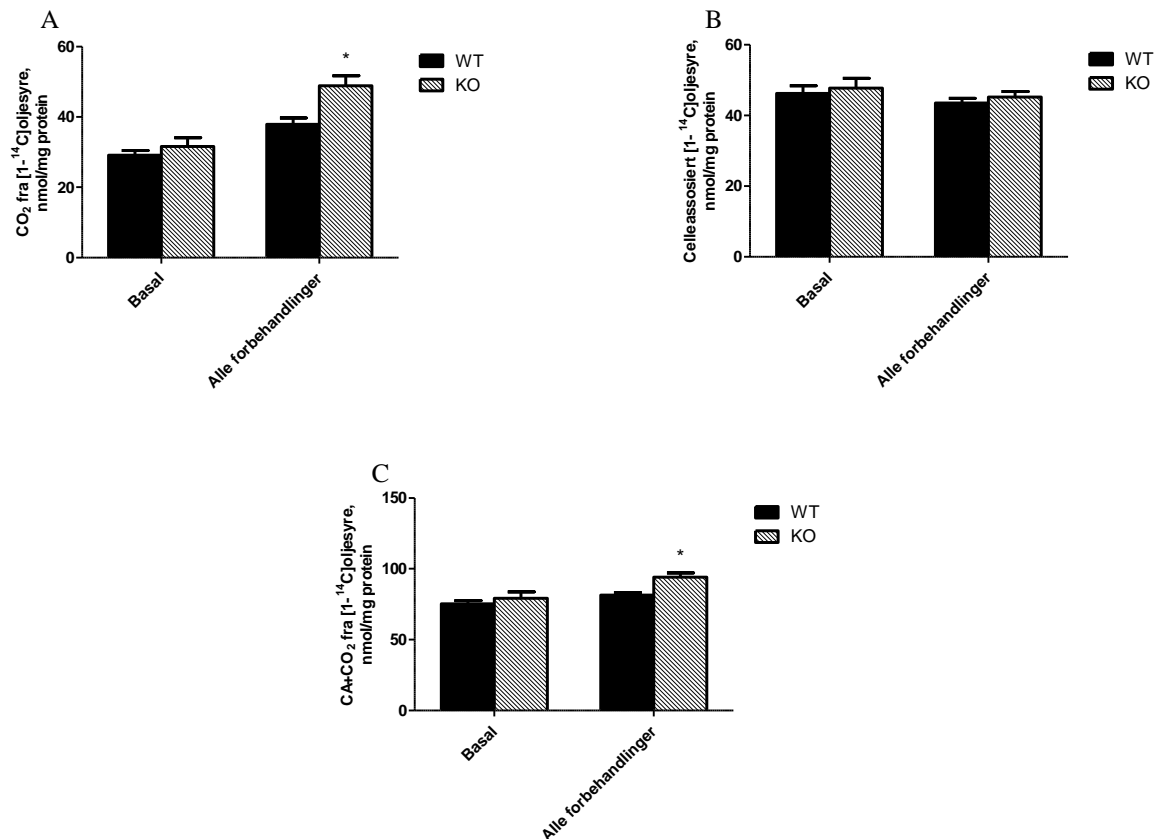
Antall lipiddråper per cellekjerne (blå) var signifikant lavere hos *PLIN2-KO* myotuber sammenlignet med *PLIN2-WT* myotuber ( $p<0,001$ ) både uten forbehandling med oljesyre, og med forbehandling med 100  $\mu\text{M}$  og 400  $\mu\text{M}$  OA (figur 17A). Det er en liten økning i antall LD med økende konsentrasjon OA. Hos *PLIN2-WT* myotuber er det størst forskjell mellom basal og 100  $\mu\text{M}$  OA, mens hos *PLIN2-KO* myotuber er det en liten økning mellom 100  $\mu\text{M}$  og 400  $\mu\text{M}$  OA. Det er ingen signifikant forskjell i størrelsen av LD mellom donorene (figur 17B), mens det kan se ut som at i tillegg til at det er færre LD i *PLIN2-KO* myotuber, er lipiddråpene i disse cellene mindre tettpakket, altså er intensiteten av grønnfargen per LD signifikant lavere hos *PLIN2-KO* myotuber sammenlignet med *PLIN2-WT* myotuber ( $p<0,05$ ) (figur 17C).

Det var ingen signifikant forskjell i mengde mitokondrier mellom de to donorene, men *PLIN2-WT* myotuber viste en svak tendens til større mengde mitokondrier enn *PLIN2-KO* myotuber når intensiteten av rødfargen i bildene per kjerne ble sammenlignet (data ikke vist).

Tilsetning av FCCP til mediet noen timer før forsøk hadde ingen utslag på mengde mitokondrier.

### 3.3 Opptak, akkumulering og oksidasjon av oljesyre og glukose

Substratoksidasjonsforsøk ble utført tre ganger på KO5 donoren, samt en gang på hver av WT donorene (WT1, WT2 og WT17). Dataene fra *PLIN2-WT* myotuber ble slått sammen, for å undersøke forskjell i opptak, akkumulering og oksidasjon av [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ]oljesyre i *PLIN2-WT* myotuber sammenlignet med *PLIN2-KO* myotuber (figur 18).



**Figur 18: Forskjell i lipidmetabolismen mellom *PLIN2-WT* og *PLIN2-KO* myotuber.** Figuren viser forskjell i oksidasjon (A), akkumulering (B) og totalopptak (C) av [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ]oljesyre mellom *PLIN2-KO* og *PLIN2-WT* myotuber etter 4 timers inkubering med [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ]oljesyre (0,5  $\mu\text{Ci/ml}$ , 100  $\mu\text{M}$ ). Dataene presenteres som gjennomsnitt  $\pm$  SEM av basalverdier og av alle behandlinger,  $n=3$ . Statistiske analyser ble utført ved hjelp av tosidig uparet t-test og ved hjelp av SPSS med linear blandet modell (LMM) analyse,  $*p<0,001$  for KO vs. WT.

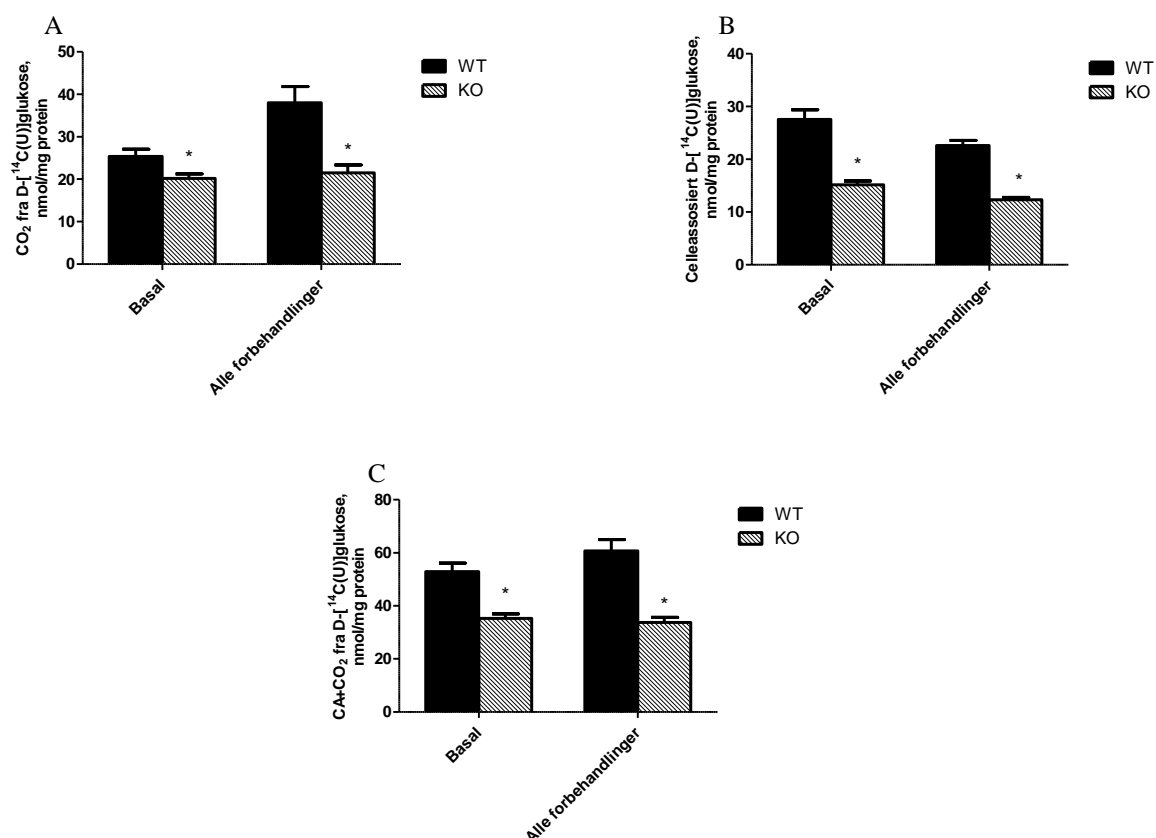
Dataene som presenteres viser både basalverdier og samlede verdier fra alle forbehandlinger for *PLIN2-WT* og *PLIN2-KO* myotuber, noe som omfatter forbehandling med 10 nM



GW501516 i to døgn, samt akuttbehandling med 100  $\mu\text{M}$  glukose  $\pm$  GW501516, og 1  $\mu\text{M}$  FCCP. For basalverdiene, som er trapping med  $[1-^{14}\text{C}]$ oljesyre uten noen forbehandling eller andre substrater i trappemediet, var det ingen signifikant forskjell i hverken oksidasjon eller akkumulering etter 4 timers inkubering med  $[1-^{14}\text{C}]$ oljesyre (figur 18A, B). Dersom verdiene for alle forbehandlingene slås sammen ved hjelp av LMM statistisk analyse av data (SPSS), kommer økningen i oksidasjon tydeligere frem, og det er signifikant høyere oksidasjon av  $[1-^{14}\text{C}]$ oljesyre i *PLIN2-KO* myotuber sammenlignet med *PLIN2-WT* myotuber ( $p < 0,001$ ) (figur 18A).

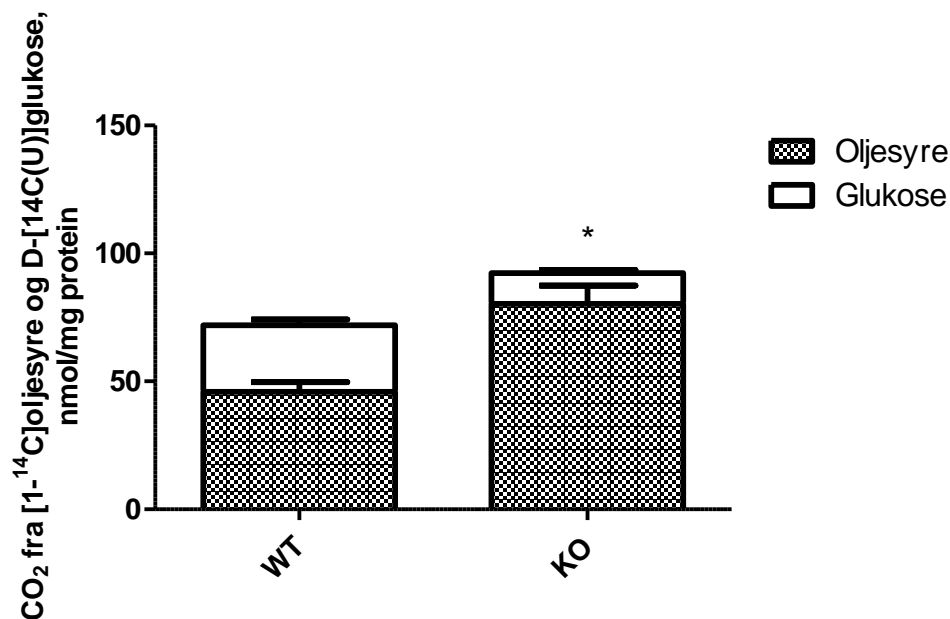
Celleassosiert (CA) data viser kun innholdet av  $[1-^{14}\text{C}]$ oljesyre i cellene etter at 4 timers trapping er utført, og for å få et bilde av totalopptaket i cellene i løpet av 4 timer legges oksidasjon og celleassosierte data sammen (figur 18C). Også her er det ikke signifikant forskjell mellom donorene under basalforhold, men etter at verdiene for alle behandlingene er lagt sammen ser man signifikant økt totalopptak i *PLIN2-KO* myotuber sammenlignet med *PLIN2-WT* myotuber ( $p < 0,001$ ). Dette reflekterer den økte oksidasjonen hos *PLIN2-KO* myotuber, da det ikke er noen forskjell i akkumulering (celleassosiert radioaktivitet).

Samme forsøk som over ble også utført med ved å trappe 100  $\mu\text{M}$  D- $[^{14}\text{C}(\text{U})]$ glukose i 4 timer, for å studere forskjeller i oksidasjon, akkumulering og opptak av glukose mellom donortypene (figur 20).



**Figur 19: Forskjell i glukosemetabolismen mellom *PLIN2-WT* og *PLIN2-KO* myotuber.** Figuren viser forskjell i oksidasjon (A), akkumulering (B) og totalopptak (C) av D-[<sup>14</sup>C(U)]glukose mellom *PLIN2-KO* myotuber og *PLIN2-WT* myotuber etter 4 timers inkubering med D-[<sup>14</sup>C(U)]glukose (0,1 µCi/ml, 100 µM). Dataene presenteres som gjennomsnitt ± SEM av basalverdier og av alle behandlinger, n=3. Statistiske analyser ble utført ved hjelp av tosidig uparet t-test og ved hjelp av SPSS med linear blandet modell analyse (LMM), \*p<0,001 for KO vs. WT.

Både oksidasjon og akkumulering av glukose var signifikant lavere hos *PLIN2-KO* myotuber enn hos *PLIN2-WT* myotuber, noe som kommer frem både ved basalsituasjonen og etter at alle forbehandlingene er slått sammen (figur 19A, B). Dette reflekteres også i totalopptaket (CO<sub>2</sub>+CA), hvor *PLIN2-KO* myotuber totalt tar opp signifikant mindre glukose (p<0,001) (figur 19C). For å kunne sammenligne den totale oksidasjonen av glukose og oljesyre hos *PLIN2-WT* myotuber og *PLIN2-KO* myotuber, ble CO<sub>2</sub> verdier for alle behandlinger for begge energisubstratene (OA og glukose) slått sammen i én graf (figur 20).



**Figur 20: Forskjell i total oksidasjon mellom *PLIN2-WT* og *PLIN2-KO* myotuber.** Figuren viser total oksidasjon av  $[1-^{14}\text{C}]$ oljesyre og  $\text{D}-[^{14}\text{C}(\text{U})]$ glukose hos *PLIN2-WT* og *PLIN2-KO* myotuber. Verdier for oksidasjon av  $\text{D}-[^{14}\text{C}(\text{U})]$ glukose er justert med en faktor på 3,8 i forhold til oksidasjon av  $[1-^{14}\text{C}]$ oljesyre. Dataene presenteres som gjennomsnitt  $\pm$  SEM av alle behandlinger,  $n=3$ . Statistiske analyser ble utført ved hjelp av SPSS med linear blandet modell (LMM) analyse,  $*p<0,001$  for KO vs. WT.

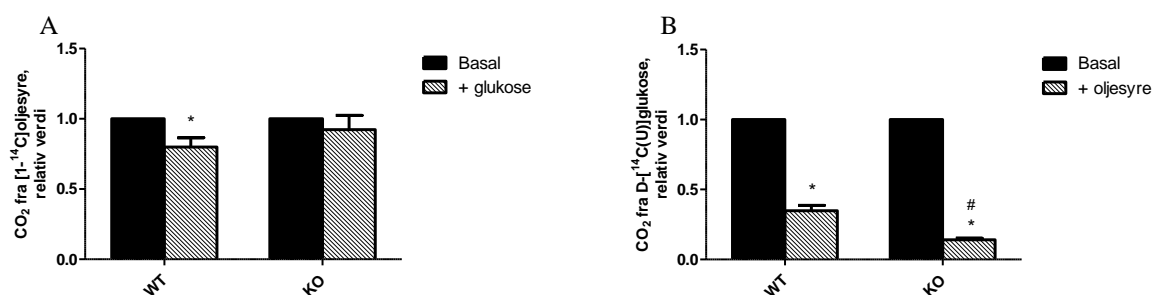
For å kunne legge inn verdiene for oksidasjon av  $[1-^{14}\text{C}]$ oljesyre og  $\text{D}-[^{14}\text{C}(\text{U})]$ glukose i samme graf, må det tas hensyn til måten substratene har blitt radioaktivt merket. Da glukose isotopen er uniformt merket, altså på hvert karbonatom, mens oljesyre kun er merket på det siste karbonatomet i fettsyrekjeden, vil glukose gi mer radioaktivitet frigjort/molekyl enn oljesyre. For å justere for dette ble verdiene for glukoseoksidasjon justert med en faktor på 3,8 i forhold til verdiene for oljesyreoksidasjon. Faktoren 3,8 er kalkulert ut fra parallelle forsøk på humane myotuber med  $\text{D}-[^{14}\text{C}(\text{U})]$ glukose og  $[^{14}\text{C}(6)]$ glukose utført av professor Arild C. Rustan ved Farmasøytisk institutt, hvor forskjellen i resultatene varierte med en faktor på 3,8 mellom isotopen som var uniformt merket og isotopen som kun var merket på karbonatom nr. 6 og som bare kan avgis som mitokondrielt  $\text{CO}_2$ .

Figur 20 illustrerer den totale oksidative kapasiteten til cellene. Den totale oksidative kapasiteten til myotubene er signifikant høyere i *PLIN2-KO* myotuber enn i *PLIN2-WT* myotuber ( $p<0,001$ ). I tillegg oksiderer myotuber fra *PLIN2-KO* mus en større andel oljesyre enn *PLIN2-WT* mus, noe som går på bekostning av glukoseoksidasjonen.



### 3.4 Effekt av «kald» glukose på oljesyreoksidasjon og «kald» oljesyre på glukoseoksidasjon

I følge Randle syklus (avsnitt 1.5.2) vil oljesyre og glukose konkurrere om oksidasjon i cellen, og økte konsentrasjoner av det ene energisubstratet vil hemme cellens forbruk av det andre substratet. Til substratoksidasjonsforsøkene ble det tilsatt 100  $\mu\text{M}$  kald (umerket) glukose akutt til trappemediet som inneholdt  $[1-^{14}\text{C}]$ oljesyre for å studere effekten av glukose på oljesyreoksidasjon, og 100  $\mu\text{M}$  kald (umerket) oljesyre akutt til trappemediet som inneholdt  $\text{D}-[^{14}\text{C}(\text{U})]$ glukose for å studere effekten av oljesyre på glukoseoksidasjon, før cellene ble inkubert og radioaktiviteten trappet i 4 timer.

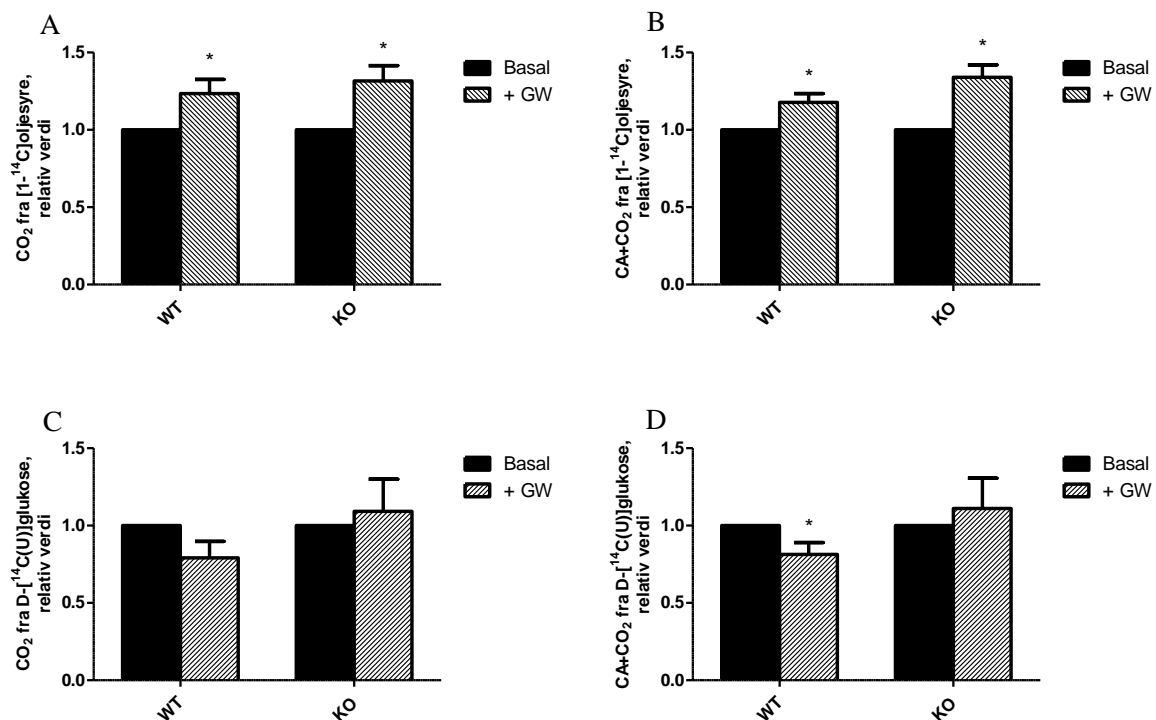


**Figur 21: Oksidasjon av  $[1-^{14}\text{C}]$ oljesyre og  $\text{D}-[^{14}\text{C}(\text{U})]$ glukose tilsatt henholdsvis kald glukose og kald oljesyre, relative verdier.** Figuren viser effekten av 100  $\mu\text{M}$  kald glukose på oksidasjon av  $[1-^{14}\text{C}]$ oljesyre (A) og effekten av 100  $\mu\text{M}$  kald oljesyre på oksidasjon av  $\text{D}-[^{14}\text{C}(\text{U})]$ glukose (B) på *PLIN2-WT* og *PLIN2-KO* myotuber etter trapping i 4 timer, ved å relatere disse til tilsvarende verdier for basal oksidasjon. Dataene presenteres som gjennomsnitt  $\pm$  SEM av verdier med 100  $\mu\text{M}$  glukose eller 100  $\mu\text{M}$  OA relatert til basalverdiene, som settes til 1. Statistiske analyser ble utført ved hjelp av tosidig uparet t-test, \* $p < 0,05$  mot basal (A), \* $p < 0,0001$  mot basal (B) og # $p < 0,0001$  for KO vs. WT,  $n = 3$ .

Oksidasjonen av  $[1-^{14}\text{C}]$ oljesyre ble signifikant redusert ved tilsetning av 100  $\mu\text{M}$  glukose til *PLIN2-WT* myotuber ( $p < 0,05$ ), men ikke hos *PLIN2-KO* myotuber (figur 21A). Ved tilsetning av oljesyre til  $\text{D}-[^{14}\text{C}(\text{U})]$ glukose mediet, ble oksidasjonen av glukose signifikant redusert hos både *PLIN2-WT* og *PLIN2-KO* myotuber ( $p < 0,0001$ ) (figur 21B). Det var også interessant å se om det var noen forskjeller mellom donortypene i hvor stor grad oljesyre påvirker glukoseoksidasjonen, og det viste seg at glukoseoksidasjonen var signifikant lavere i *PLIN2-KO* myotuber sammenlignet med *PLIN2-WT* etter tilsetning av 100  $\mu\text{M}$  OA ( $p < 0,0001$ ) (figur 21B).

### 3.5 Effekt av GW501516 på opptak, akkumulering og oksidasjon av oljesyre og glukose

GW501516 er en PPAR $\delta$  agonist, som oppregulerer genuttrykket av PPAR kjernereseptorer (avsnitt 1.6.1). Siden uttrykket av *PLIN2* genet reguleres av PPAR $\delta$ , var det interessant å se om en PPAR $\delta$  agonist vil påvirke *PLIN2*-WT og *PLIN2*-KO myotuber ulikt. PPAR $\delta$  aktivering vil øke oksidasjonen av fettsyrer i myotubene, og det er grunn til å tro at myotuber som mangler *PLIN2* proteinet, og har redusert lagring av fettsyrer i LD, vil påvirkes av PPAR-aktiveringen i større grad enn myotuber som har *PLIN2* genet intakt. For å få et bedre bilde på effekten av GW501516 på *PLIN2*-KO myotuber sammenlignet med *PLIN2*-WT myotuber, ble verdiene fra 4 timers inkubasjon med [1- $^{14}$ C]oljesyre og D-[ $^{14}$ C(U)]glukose etter forbehandling med 10 nM GW501516 i 48 timer fra samme forsøk relatert til gjennomsnittlig basalverdi per forsøk (basalverdi per forsøk satt til 1) (figur 22).



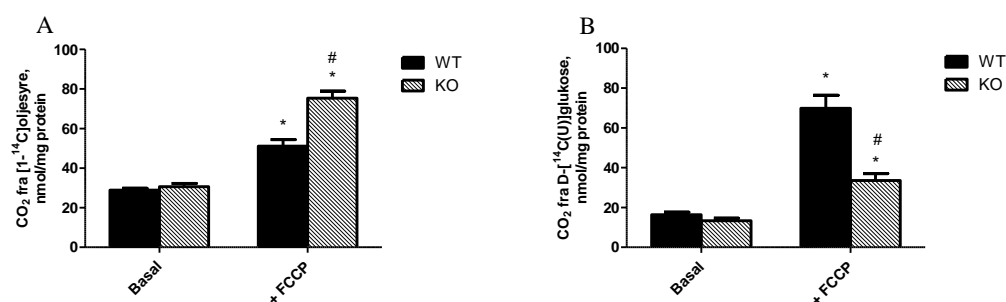
**Figur 22: Effekt av forbehandling med GW501516 på lipid- og glukosemetabolismen.** Figuren viser oksidasjon (A) og totalopptak (B) av [1- $^{14}$ C]oljesyre og oksidasjon (C) og totalopptak (D) av D-[ $^{14}$ C(U)]glukose etter forbehandling med 10 nM GW501516 i 48 timer. Dataene presenteres som gjennomsnitt  $\pm$  SEM av verdier etter forbehandling med GW501516 relatert til basalverdiene,  $n = 2-3$ . Statistiske analyser ble utført ved hjelp av tosidig paret t-test, \* $p < 0,05$  mot basal.

Det ble funnet en signifikant effekt av GW501516 på oksidasjon og totalopptak av [1-<sup>14</sup>C]oljesyre hos begge donortypene sammenlignet med basaloksidasjon ( $p < 0,05$ ) (figur 22A, B). Denne effekten var ikke forskjellig mellom KO og WT myotuber, til tross for noe høyere totalopptak i *PLIN2-KO* myotuber ( $p = 0,106$ ), noe som betyr at begge donortypene responderte i like stor grad på behandlingen (figur 22B).

Det var ingen signifikant forskjell i oksidasjon av D-[<sup>14</sup>C(U)]glukose med og uten behandling med GW501516, men det var en tendens til lavere oksidasjon av D-[<sup>14</sup>C(U)]glukose hos *PLIN2-WT* myotuber ( $p = 0,075$ ) (figur 22C). Denne tendensen kom bedre frem på totalopptak av D-[<sup>14</sup>C(U)]glukose, hvor opptaket var signifikant lavere hos *PLIN2-WT* myotuber som var behandlet med GW501516 sammenlignet med basal ( $p < 0,05$ ) (figur 22D). For *PLIN2-KO* myotuber ble det ikke funnet noen signifikante forskjeller eller tendenser hverken i oksidasjon eller opptak av D-[<sup>14</sup>C(U)]glukose etter behandling med GW501516 (figur 22C, D).

### 3.6 Effekt av FCCP på oljesyreoksidasjon og glukoseoksidasjon

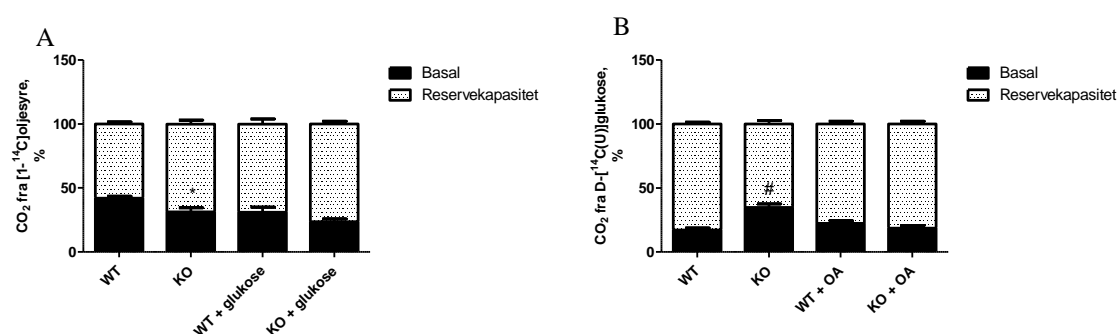
I substratoksidasjonsforsøkene ble halvparten av myotubene på hvert brett tilsatt 1  $\mu$ M FCCP i akuttmediet (trappemediet), i tillegg til de øvrige behandlingene. FCCP frikobler mitokondriene i cellene, og man får ut hele potensialet cellen har til å oksidere oljesyre og glukose (avsnitt 1.6.2). På denne måten kan det sammenlignes om det er en forskjell i maksimal oksidativ kapasitet mellom myotuber fra *PLIN2-WT* og *PLIN2-KO* mus, og om det er noen forskjell mellom oljesyre og glukose.



**Figur 23: Effekt av FCCP på oksidasjon av [1-<sup>14</sup>C]oljesyre og D-[<sup>14</sup>C(U)]glukose.** Myotuber fra *PLIN2-WT* og *PLIN2-KO* mus ble inkubert med [1-<sup>14</sup>C]oljesyre (A) og D-[<sup>14</sup>C(U)]glukose (B) i 4 timer ± FCCP (1 μM). Figuren viser basaloksidasjon og oksidasjon ved tilsatt FCCP for alle andre forbehandlinger slått sammen. Dataene presenteres som gjennomsnitt ± SEM, n = 2-3. Statistiske analyser ble utført ved hjelp av SPSS med linear blandet modell (LMM) analyse, \*p<0,05 mot basal, #p<0,05 mot WT.

Det er en tydelig effekt av FCCP på begge donortypene, både oksidasjonen av [1-<sup>14</sup>C]oljesyre og D-[<sup>14</sup>C(U)]glukose er signifikant høyere hos *PLIN2-WT* myotuber og *PLIN2-KO* myotuber (figur 23A, B). Likevel er det forskjeller mellom WT og KO når det kommer til i hvor stor grad oksidasjonen av energisubstratene øker. Oksidasjon av [1-<sup>14</sup>C]oljesyre øker signifikant mer hos *PLIN2-KO* myotuber enn hos *PLIN2-WT* myotuber, mens oksidasjon av D-[<sup>14</sup>C(U)]glukose øker mer hos *PLIN2-WT* myotuber enn *PLIN2-KO* myotuber (p<0,05) (figur 23A, B).

For å få et bilde på hvor mye av den maksimale oksidative kapasiteten som utnyttes ved basal oksidasjon, fremstilles verdiene for basal oksidasjon (uten FCCP) som prosent av maksimal oksidasjon (med FCCP). Differansen kalles myotubenes reservekapasitet, og figuren viser hvor mye av potensialet som blir utnyttet ved basal oksidasjon (figur 24).

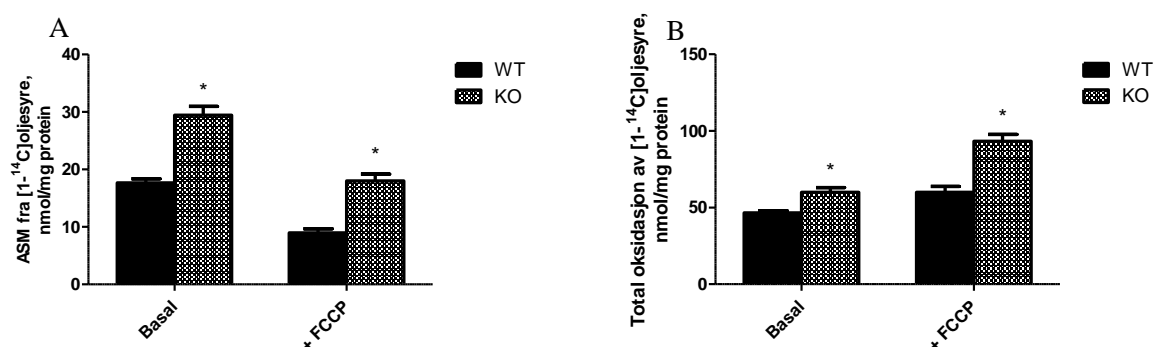


**Figur 24: Basaloksidasjon og oksidativ reservekapasitet av oljesyre og glukose hos *PLIN2-WT* myotuber sammenlignet med *PLIN2-KO* myotuber.** Figuren viser basaloksidasjon og reservekapasitet for oksidasjon av [1-<sup>14</sup>C]oljesyre ± glukose (A) og basaloksidasjon og reservekapasitet for oksidasjon av D-[<sup>14</sup>C(U)]glukose ± OA (B) hos *PLIN2-WT* og *PLIN2-KO* myotuber. Statistiske analyser ble utført ved hjelp av tosidig uparet t-test, \*p<0,01, #p<0,001 for KO vs. WT, n=2-3.

Det var signifikant forskjell mellom hvor stor andel av reservekapasiteten som ble benyttet hos *PLIN2-KO* myotuber sammenlignet med *PLIN2-WT* myotuber (figur 24). *PLIN2-KO* myotuber utnytter en lavere andel av myotubenes maksimale oksidative kapasitet enn *PLIN2-WT* myotuber ved oljesyreoksidasjon ( $p < 0,01$ ) (figur 24A). Ved glukoseoksidasjon utnytter *PLIN2-KO* myotuber en større andel av det oksidative potensialet enn *PLIN2-WT* myotuber ( $p < 0,001$ ) (figur 24B). Disse prosentvise forskjellene reflekterer den henholdsvis økte og reduserte maksimale oksidative kapasiteten av oljesyre- og glukoseoksidasjon hos *PLIN2-WT* myotuber sett i forhold til *PLIN2-WT* myotuber.

### 3.7 Total oljesyreoksidasjon

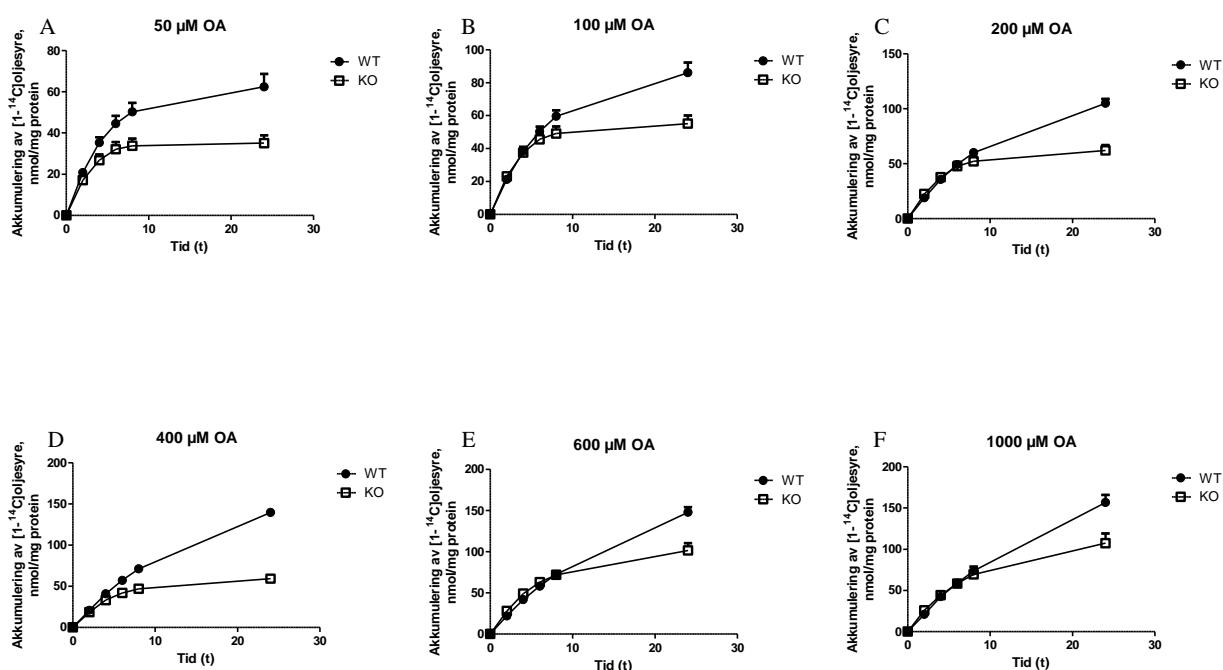
Analyse av syreløselige metabolitter (ASM) er et mål på  $\beta$ -oksidasjon i cellene og ble utført på 30  $\mu$ l av mediet fra 4 timers oljesyreoksidasjonsforsøk, for å skaffe et mer totalt bilde på oksidasjon av OA i myotubene. Mengde syreløselige metabolitter fra  $[1-^{14}\text{C}]$ oljesyre var signifikant høyere i medium fra *PLIN2-KO* sammenlignet med *PLIN2-WT* myotuber ( $p < 0,001$ ), noe som viser at det har vært en høyere ufullstendig lipidoksidasjon i disse cellene (figur 25A). Data for ASM ble slått sammen med  $\text{CO}_2$  oksidasjons data fra de samme cellene som mediet ble hentet fra. Til sammen gir dette et bilde på den totale oljesyreoksidasjonen i *PLIN2-WT* og *PLIN2-KO* myotuber etter 4 timers trapping med  $[1-^{14}\text{C}]$ oljesyre. Den totale lipidoksidasjonen var signifikant høyere hos *PLIN2-KO* myotuber sammenlignet med *PLIN2-WT* myotuber ( $p < 0,001$ ) (figur 25B).



**Figur 25: Oljesyreoksidasjon i *PLIN2-WT* og *PLIN2-KO* myotuber.** Analyse av syreløselige metabolitter (ASM) (A) og total oksidasjon (ASM+ $\text{CO}_2$ ) (B) av  $[1-^{14}\text{C}]$ oljesyre i *PLIN2-WT* og *PLIN2-KO* myotuber  $\pm 1 \mu\text{M}$  FCCP. Dataene presenteres som gjennomsnitt  $\pm$  SEM av basalverdier og verdier etter tilsetning av FCCP, (data for alle andre behandlinger slått sammen),  $n = 2-3$ . Statistiske analyser ble utført ved hjelp av SPSS med linear blandet modell (LMM) analyse, \* $p < 0,001$  for KO vs. WT.

### 3.8 Kronisk akkumulering av oljesyre ved ulike oljesyrekonsentrasjoner

Data fra substratoksidasjonsforsøk viste ingen forskjell i lipidakkumulering av  $[1-^{14}\text{C}]$ oljesyre i cellene etter 4 timers inkubering med  $100\ \mu\text{M}$   $[1-^{14}\text{C}]$ oljesyre, men bilder fra mikroskopering og imaging viser tydelig at etter 24 timers inkubering med  $100\ \mu\text{M}$  OA og  $400\ \mu\text{M}$  OA er det færre lipiddråper i *PLIN2-KO* myotuber sammenlignet med *PLIN2-WT* myotuber. Dette kan tyde på at det mellom 4 timer og 24 timers inkubering oppstår en forskjell i akkumulering av lipider mellom donortypene. For å undersøke dette ble scintillation proximity assay (SPA) utført på cellene (avsnitt 2.4), og akkumulering av  $[1-^{14}\text{C}]$ oljesyre ved flere forskjellige konsentrasjoner av OA ble målt ved ulike tidsintervaller over 24 timer.



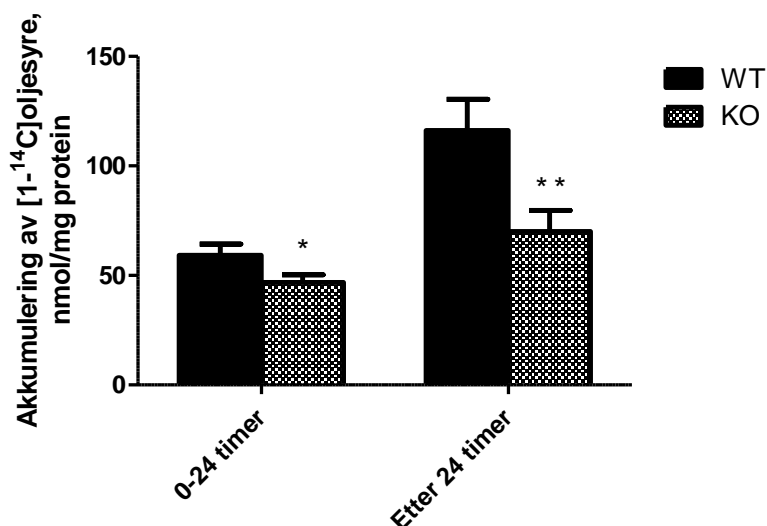
**Figur 26: Akkumulering av  $[1-^{14}\text{C}]$ oljesyre i *PLIN2-WT* myotuber og *PLIN2-KO* myotuber ved forskjellige konsentrasjoner OA over 24 timer.** Figurene viser akkumulering av  $[1-^{14}\text{C}]$ oljesyre etter eksponering av 50  $\mu\text{M}$  (A), 100  $\mu\text{M}$  (B), 200  $\mu\text{M}$  (C), 400  $\mu\text{M}$  (D), 600  $\mu\text{M}$  (E) og 1000  $\mu\text{M}$  (F) oljesyre i 24 timer. Data for hvert punkt vises som gjennomsnitt  $\pm$  SEM,  $n = 2$ .

Akkumulering av  $[1-^{14}\text{C}]$ oljesyre i myotubene øker over tid for begge donorene, men etter ca. 6-8 timers inkubering begynner *PLIN2-WT* myotubene å øke raskere enn *PLIN2-KO* myotubene og etter 24 timers inkubering er det en tydelig forskjell i mengde  $[1-^{14}\text{C}]$ oljesyre

akkumulert i cellene, hvor det er mindre mengde akkumulert oljesyre hos KO myotuber enn hos WT myotuber (figur 26).

Forskjellen mellom WT og KO donorene blir også klarere ved høyere konsentrasjoner OA, noe som vises ved mindre spredning.

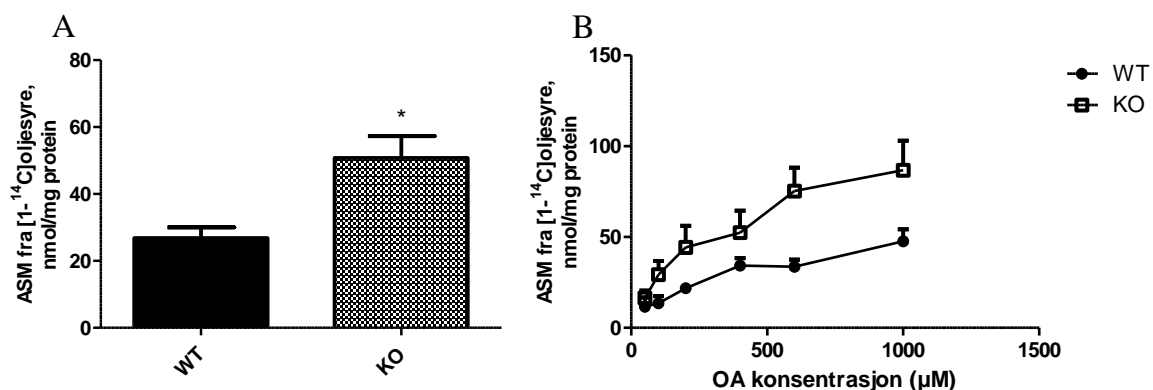
Ved å legge sammen resultatene for akkumulering over 24 timer for alle konsentrasjonene av OA for hele tidsperioden, er det signifikant lavere mengde OA akkumulert i *PLIN2-WT* myotuber enn i *PLIN2-KO* myotuber ( $p < 0,001$ ). Også ved 24 timers punktet for akkumulering av alle OA-konsentrasjoner er forskjellen mellom donorene signifikant ( $p < 0,005$ ), og økt i forhold til alle tidspunktene slått sammen (figur 27).



**Figur 27: Akkumulering av  $[1-^{14}\text{C}]$ oljesyre i *PLIN2-WT* myotuber og *PLIN2-KO* myotuber over 24 timer og ved 24 timers punktet.** Figuren viser akkumulering av OA over 24 timer og mengde akkumulert ved 24 timers punktet i *PLIN2-WT* og *PLIN2-KO* myotuber. Dataene presenteres som gjennomsnitt  $\pm$  SEM for alle konsentrasjoner av OA slått sammen,  $n = 2$ . Statistiske analyser ble utført ved hjelp av SPSS med linear blandet modell (LMM) analyse, \* $p < 0,001$  for KO vs. WT, \*\* $p < 0,005$  for KO vs. WT.

### 3.8.1 Analyse av syreløselige metabolitter (ASM)

Etter måling av  $[1-^{14}\text{C}]$ oljesyreakkumulering i 24 timer ble 30  $\mu\text{l}$  av inkubasjonsmediet tatt ut til felling og måling av syreløselige metabolitter, ASM. Dette er som nevnt tidligere et mål på  $\beta$ -oksidasjonen av oljesyre i myotubene.



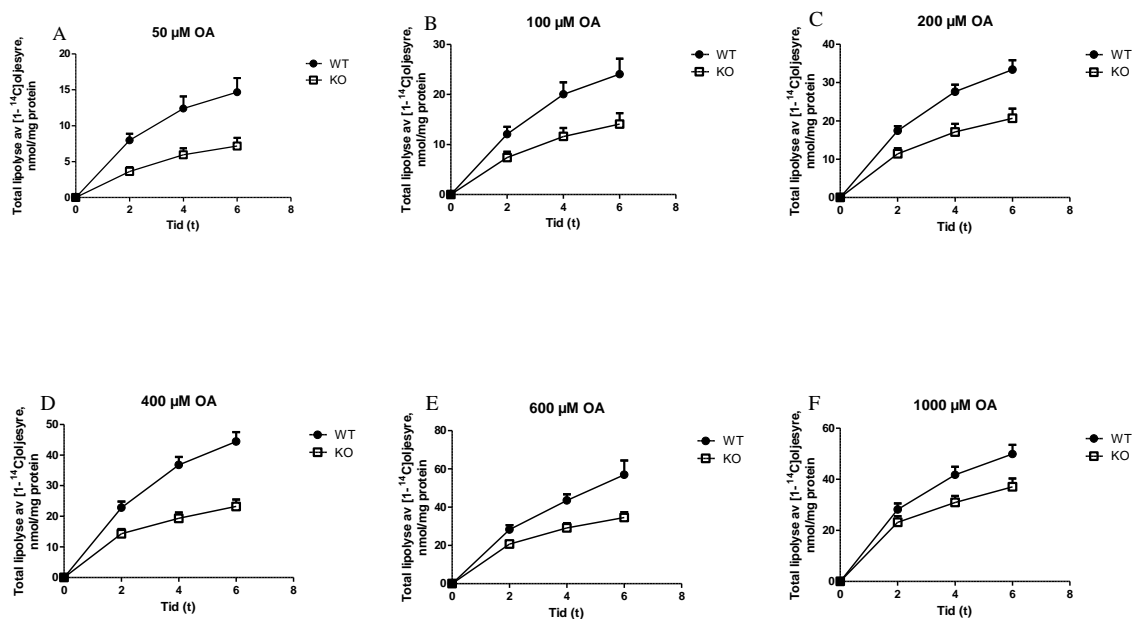
**Figur 28: Analyse av syreløselige metabolitter (ASM) av [1-<sup>14</sup>C]oljesyre i *PLIN2-WT* og *PLIN2-KO* myotuber.** ASM målt etter 24 timers inkubasjon med [1-<sup>14</sup>C]oljesyre i forskjellige konsentrasjoner. Dataene presenteres som gjennomsnitt ± SEM av alle konsentrasjonene slått sammen (A) og for hver konsentrasjon (B), n = 2. Statistiske analyser ble utført ved hjelp av SPSS med linear blandet modell (LMM) analyse, \*p<0,001 for KO vs. WT.

Det er signifikant høyere oksidasjon av fettsyrer i *PLIN2-KO* myotuber sammenlignet med *PLIN2-WT* myotuber når alle konsentrasjonene av OA legges sammen (p<0,001). Forskjellen øker med økende konsentrasjon OA, men kommer også frem ved lavere konsentrasjoner (figur 28).

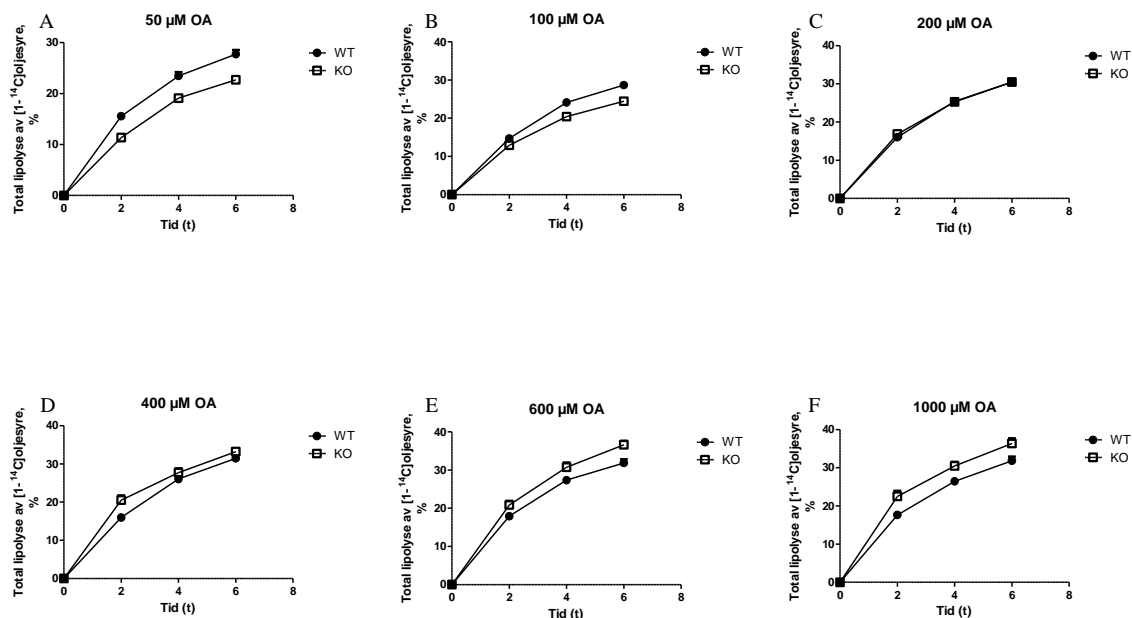
### 3.9 Total lipolyse av oljesyre ved forskjellige oljesyrekonsentrasjoner

For at nøytrale lipider som er lagret i LD i myotuber skal kunne brukes som energikilde i Krebs syklus, må lipidene først gjennomgå lipolyse fra TAG til FFA (se 1.3.4). For å måle lipolyse over tid, ble mediet med radioaktiv oljesyre etter 24 timers akkumulering fjernet, og erstattet med «chasemedium». Dette er et fettsyrefritt medium med 0,5 % BSA ± triacsin C, som er en acyl-CoA syntetasehemmer. Etter tilsetning av chasemedium ble [1-<sup>14</sup>C]oljesyre akkumulert raskt målt i MicroBeta, dette representerer tid 0. Deretter ble frigjøringen av [1-<sup>14</sup>C]oljesyre som et resultat av lipolyse av IMCL målt etter 2, 4 og 6 timer. Her vises kun total lipolyse, som er lipolyse i myotuber målt i nærvær av triacsin C (figur 29).



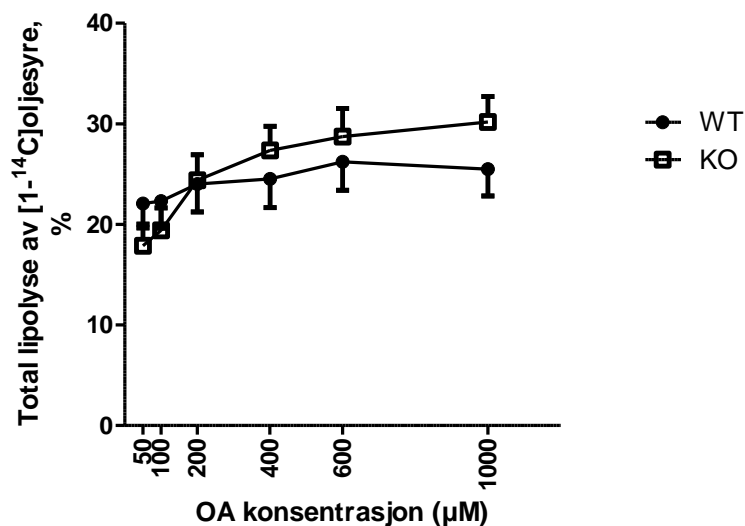


**Figur 29: Total lipolyse av  $[1-^{14}\text{C}]$ oljesyre ved forskjellige konsentrasjoner over 6 timer.** Figurene viser lipolyse av  $[1-^{14}\text{C}]$ oljesyre etter eksponering av 50  $\mu\text{M}$  (A), 100  $\mu\text{M}$  (B), 200  $\mu\text{M}$  (C), 400  $\mu\text{M}$  (D), 600  $\mu\text{M}$  (E) og 1000  $\mu\text{M}$  (F) oljesyre med triacsin C over 6 timer. Data for hvert punkt vises som gjennomsnitt  $\pm$  SEM i absolutte verdier, nmol/mg,  $n = 2$ .



**Figur 30: Prosentvis total lipolyse av  $[1-^{14}\text{C}]$ oljesyre ved forskjellige konsentrasjoner over 6 timer.** Figurene viser lipolyse av  $[1-^{14}\text{C}]$ oljesyre etter eksponering av 50  $\mu\text{M}$  (A), 100  $\mu\text{M}$  (B), 200  $\mu\text{M}$  (C), 400  $\mu\text{M}$  (D), 600  $\mu\text{M}$  (E) og 1000  $\mu\text{M}$  (F) oljesyre med triacsin C over 6 timer. Data for hvert punkt vises som gjennomsnitt  $\pm$  SEM i % av mengde oljesyre tilstede i cellen ved tid 0,  $n = 2$ .

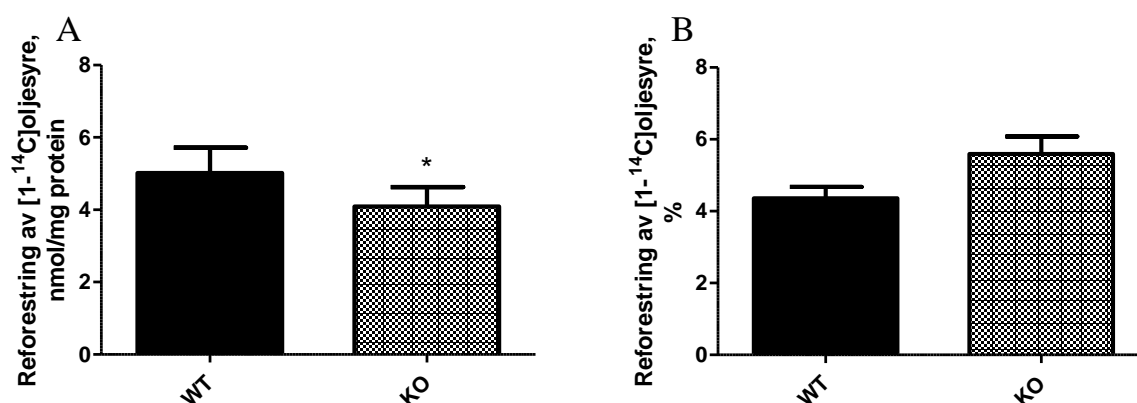
Det var lavere total lipolyse i KO myotuber sammenlignet med WT myotuber i absolutte verdier (nmol/mg) (figur 29), men når lipolyse ble beregnet som andel lipolyse ut fra OA akkumulert i nmol/mg ved 1000  $\mu\text{M}$  OA, tid 0 (som prosentvis lipolyse) er det ingen klar forskjell mellom donorene (figur 30). Dette tyder på at lipolyse er avhengig av hvor mye lipider som befinner seg i cellen, og når det justeres for dette er det ikke forskjell mellom *PLIN2-WT* og *PLIN2-KO* myotuber. Med andre ord, forskjellen observert i absolutte tall skyldes forskjellen i akkumulering av OA mellom de to donortypene. Likevel kan det se ut som om det er en konsentrasjonsavhengig økning av lipolyse hos *PLIN2-KO* myotuber. Mens prosentvis lipolyse holder seg jevnt ved ulike konsentrasjoner OA hos *PLIN2-WT* myotuber, stiger prosentvis lipolyse i *PLIN2-KO* myotuber med økende OA-konsentrasjon. Fra ca. 200  $\mu\text{M}$  til 1000  $\mu\text{M}$  OA er den prosentvise lipolysen av  $[1-^{14}\text{C}]$ oljesyre i *PLIN2-KO* myotuber høyere enn hos *PLIN2-WT* myotuber (figur 31).



**Figur 31: Prosentvis total lipolyse i *PLIN2-WT* og *PLIN2-KO* myotuber ved økende OA-konsentrasjoner.** Figuren viser total lipolyse av  $[1-^{14}\text{C}]$ oljesyre ved økende konsentrasjon OA, i % av mengde OA akkumulert i myotubene ved tid 0. Data presenteres som gjennomsnitt  $\pm$  SEM av 8 paralleller for hvert forsøk,  $n=2$ .

### 3.10 Reforestring

For å beregne hvor mye av FFA som frigjøres ved lipolyse som så blir reforestret til TAG, ble basal lipolyse trukket fra total lipolyse (lipolyse med triacsin C). Differansen gir et mål på reforestring av OA.

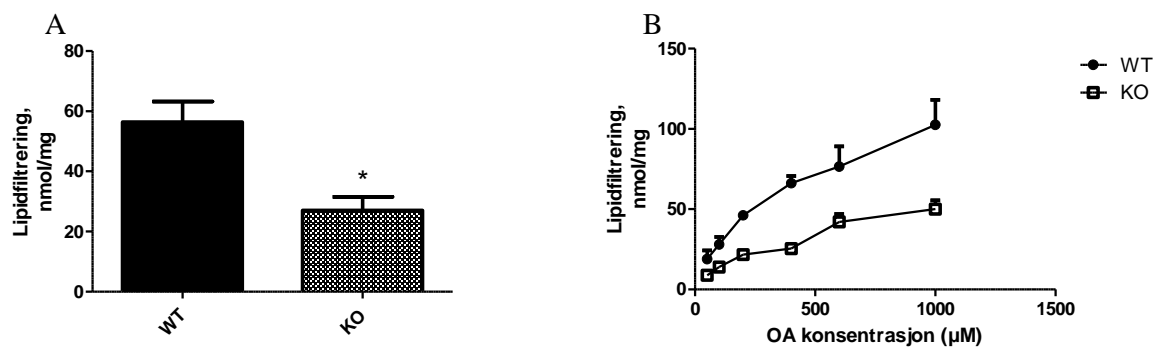


**Figur 32: Reforestring av [1-<sup>14</sup>C]oljesyre i *PLIN2-WT* og *PLIN2-KO* myotuber.** Figuren viser reforestring av [1-<sup>14</sup>C]oljesyre (total lipolyse – basal lipolyse) hos *PLIN2-WT* og *PLIN2-KO* myotuber i løpet av 6 timers inkubering, som nmol/mg (A) og som prosent av mengde OA akkumulert i myotubene ved 24 timers punktet (B). Resultatene er gitt i gjennomsnitt ± SEM av alle konsentrasjoner OA og alle tidspunkter for måling av lipolyse. Statistiske analyser ble utført ved hjelp av SPSS med linear blandet modell (LMM) analyse, \*p<0,01 for KO vs. WT, n=2.

Tallene for reforestring er noe usikre (lave verdier, noen verdier var også negative). Det kan likevel tyde på at mengden FFA som reforestres er lavere hos *PLIN2-KO* myotuber enn hos *PLIN2-WT* myotuber, da forskjellen er signifikant når alle OA konsentrasjonene for hele tidsperioden slås sammen (p<0,01) (figur 32A). Når reforestringen beregnes i prosent av mengden OA som er akkumulert i myotubene, snur bildet seg, og det er en noe høyere prosentvis reforestring i *PLIN2-KO* myotuber sammenlignet med *PLIN2-WT* myotuber (figur 32B). Det blir derfor vanskelig å trekke noen konklusjoner om reforestring.

### 3.11 Lipidfiltrasjon

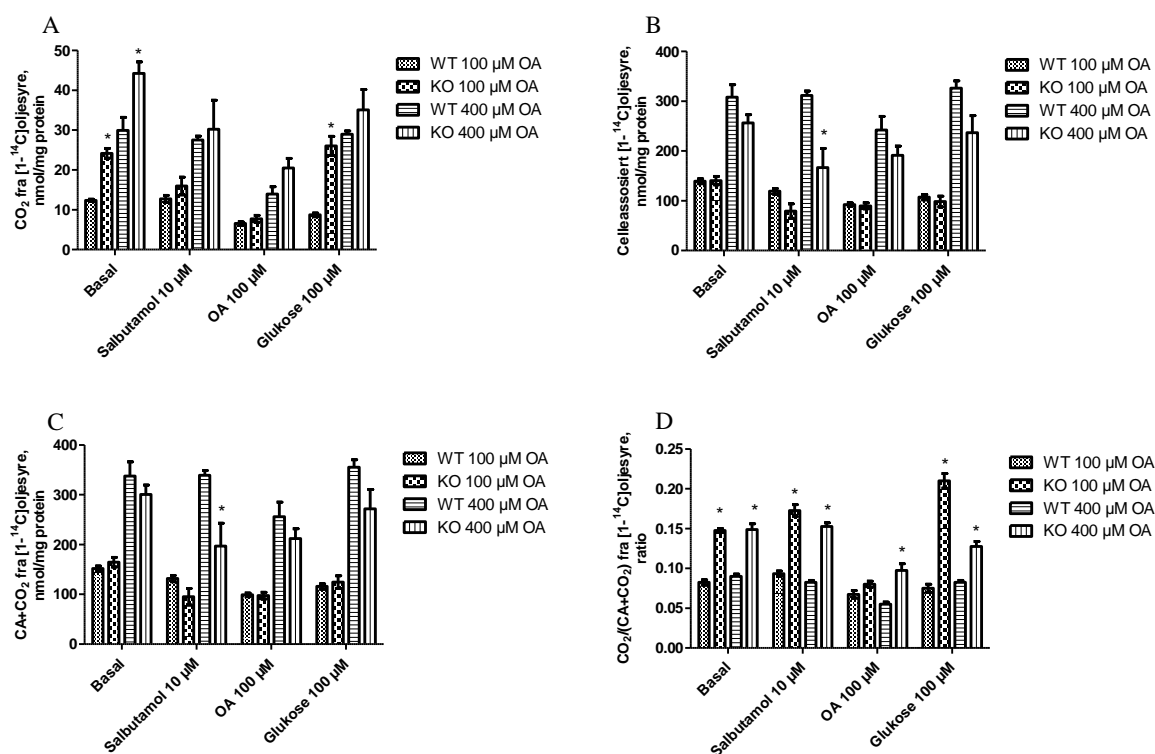
Det ble utført lipidfiltrasjon på cellelysatsat etter gjennomført SPA forsøk, for å undersøke forskjell i mengde akkumulerte nøytrale lipider fra OA i myotubene. Metoden er mer spesifikk enn måling av akkumulering ved CA og SPA. Data fra alle OA konsentrasjoner og data med og uten triacsin C tilsatt ble slått sammen, for å se på den totale forskjellen mellom *PLIN2-WT* og *PLIN2-KO* myotuber. *PLIN2-KO* myotuber ga signifikant lavere lipidakkumulering fra OA sammenlignet med *PLIN2-WT* myotuber (p<0,001) etter 24 timers inkubering med [1-<sup>14</sup>C]oljesyre etterfulgt av 6 timers lipolyse (figur 33A, B).



**Figur 33: Akkumulering av nøytrale lipider i *PLIN2-WT* og *PLIN2-KO* myotuber.** Figuren viser mengde nøytrale lipider akkumulert i myotubene fra *PLIN2-WT* og *PLIN2-KO* mus etter 24 timers inkubering med [ $^{14}\text{C}$ ]oljesyre og 6 timers lipolyse, for alle konsentrasjoner av OA slått sammen (**A**) og for hver konsentrasjon (**B**). Resultatene er gitt i gjennomsnitt  $\pm$  SEM,  $n=1-2$ . Statistiske analyser ble utført ved hjelp av SPSS med linear blandet modell (LMM) analyse,  $*p<0,001$  for KO vs. WT.

### 3.12 Effekt av 24 timers formerking med oljesyre

Cellene ble dyrket på 96-brønners brett og forbehandlet med 100  $\mu\text{M}$  og 400  $\mu\text{M}$  [ $^{14}\text{C}$ ]oljesyre i 24 timer før det radioaktive mediet ble fjernet og erstattet med trappemedium, og cellene ble inkubert og  $\text{CO}_2$  ble trappet i 4 timer. 10  $\mu\text{M}$  salbutamol ( $\beta_2$  agonist), 100  $\mu\text{M}$  kald OA og 100  $\mu\text{M}$  kald glukose ble tilsatt akutt. Salbutamol stimulerer lipolysen av nøytrale lipider, noe som forventes å kunne gi økt oksidasjon av oljesyre gjennom å øke tilgangen til FFA til  $\beta$ -oksidasjon (avsnitt 1.6.4).



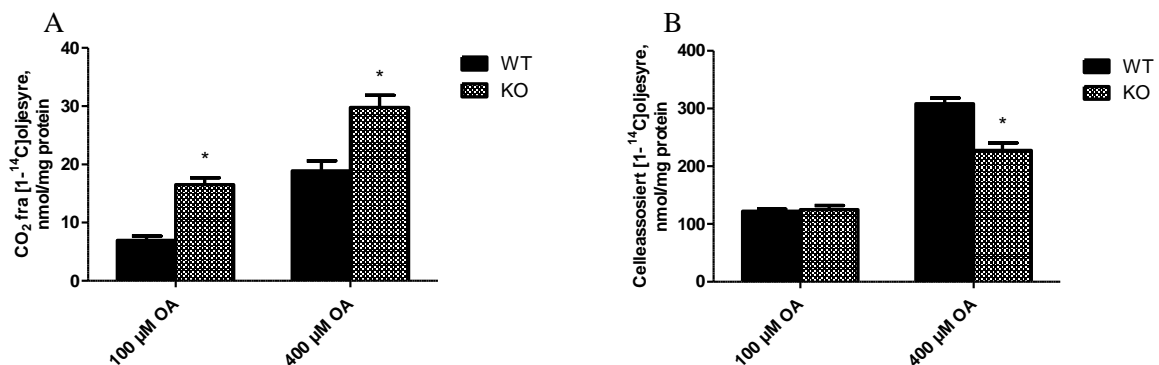
**Figur 34: Oksidasjon, akkumulering, opptak og fraksjonell oksidasjon av [1-<sup>14</sup>C]oljesyre etter 24 timers formerking av myotubene.** Figur viser oksidasjon (A), akkumulering (B), opptak (C) og fraksjonell oksidasjon (D) av oljesyre etter formerking med 100 µM og 400 µM [1-<sup>14</sup>C]oljesyre fulgt av 4 timer trapping med akuttmedier som beskrevet under x-aksen. Dataene presenteres som gjennomsnitt ± SEM av 4-8 paralleller per forsøk, n=1 per donør. Statistiske analyser ble utført ved hjelp av tosidig uparet t-test, \*p<0,05 for KO vs. WT.

Det var signifikant økt basaloksidasjon hos *PLIN2-KO* myotuber sammenlignet med *PLIN2-WT* myotuber etter 24 timers inkubering fulgt av 4 timers trapping både ved 100 µM OA og 400 µM OA (p<0,01) (figur 34A). Oksidasjonen ble i liten grad påvirket ved akuttbehandlingene med salbutamol og glukose, men var redusert hos begge donorgruppene ved 100 µM OA akutt.

Det er ingen forskjell i basal akkumulering (CA) av OA etter 28 timers (24+4 timers trapping) inkubering mellom *PLIN2-WT* og *PLIN2-KO* myotuber ved 100 µM OA, men ved 400 µM OA er det en tendens til lavere akkumulering i *PLIN2-KO* myotuber (p=0,102) (figur 34B). Denne tendensen blir forsterket ved forbehandling med salbutamol, hvor CA er signifikant lavere for *PLIN2-KO* sammenlignet med *PLIN2-WT* myotuber (p<0,05). Akkumulering er også noe redusert ved de øvrige akuttbehandlingene, men her er forskjellen mindre.

Fraksjonell oksidasjon av OA, ( $\text{CO}_2/(\text{CA}+\text{CO}_2)$ ), er signifikant høyere hos *PLIN2-KO* myotuber sammenlignet med *PLIN2-WT* myotuber ( $p<0,01$ ) (figur 34D). Fraksjonell oksidasjon er et mål på hvor stor andel av  $[1-^{14}\text{C}]$ oljesyre som oksideres i forhold til mengden som totalt tas opp i myotubene.

For å få et mer helhetlig bilde av oljesyreoksidasjon og akkumulering i *PLIN2-WT* og *PLIN2-KO* myotuber etter 24 timer formerking, ble de forskjellige forbehandlingene slått sammen for hver OA konsentrasjon (figur 35).

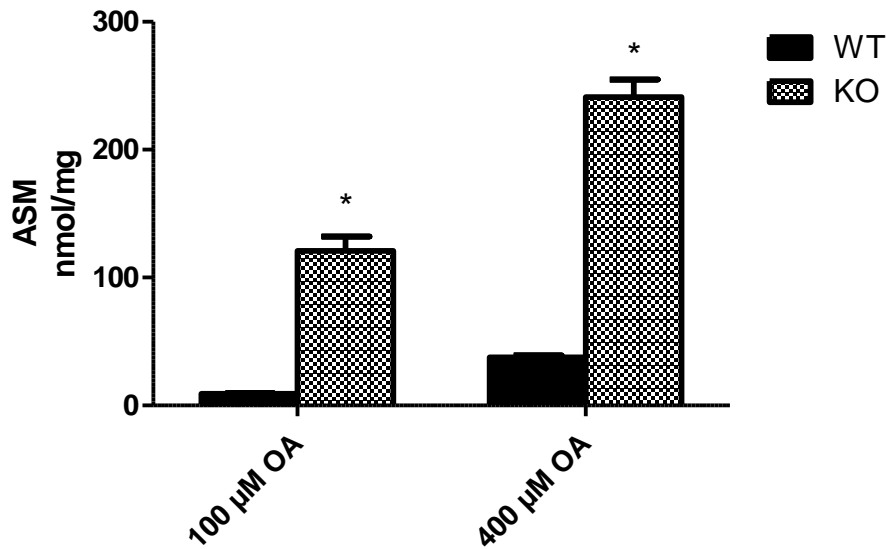


**Figur 35: Oksidasjon og akkumulering av  $[1-^{14}\text{C}]$ oljesyre i *PLIN2-WT* og *PLIN2-KO* myotuber etter 24 timers formerking av myotubene.** Figur viser oksidasjon (A) og akkumulering (B) av  $[1-^{14}\text{C}]$ oljesyre i *PLIN2-WT* og *PLIN2-KO* myotuber i løpet av 4 timers trapping, etter 24 timer formerking med  $[1-^{14}\text{C}]$ oljesyre. Dataene presenteres som gjennomsnitt  $\pm$  SEM av alle behandlinger pr OA konsentrasjon per forsøk,  $n=1$  pr donor. Statistiske analyser ble utført ved hjelp av SPSS med linear blandet modell (LMM) analyse,  $*p<0,001$  for KO vs. WT.

Ved å slå sammen alle forbehandlingene forsterkes bare de samme funnene som tidligere. Oljesyreoksidasjonen er økt for *PLIN2-KO* myotuber ( $p<0,001$ ) for begge konsentrasjoner OA (figur 35A). Akkumulering av oljesyre er lik hos *PLIN2-WT* og *PLIN2-KO* myotuber ved 100  $\mu\text{M}$  OA, men ved 400  $\mu\text{M}$  OA er det signifikant mindre OA akkumulert i *PLIN2-KO* myotuber (figur 35B).

### 3.12.1 Analyse av syreløselige metabolitter (ASM) etter 24 timer formerking

Før trapping i 4 timer ble det tatt ut 30 µl fra hver brønn av mediet fra cellene som var formerket med 100 µM og 400 µM [1-<sup>14</sup>C]oljesyre i 24 timer, til måling av syreløselige metabolitter (ASM).

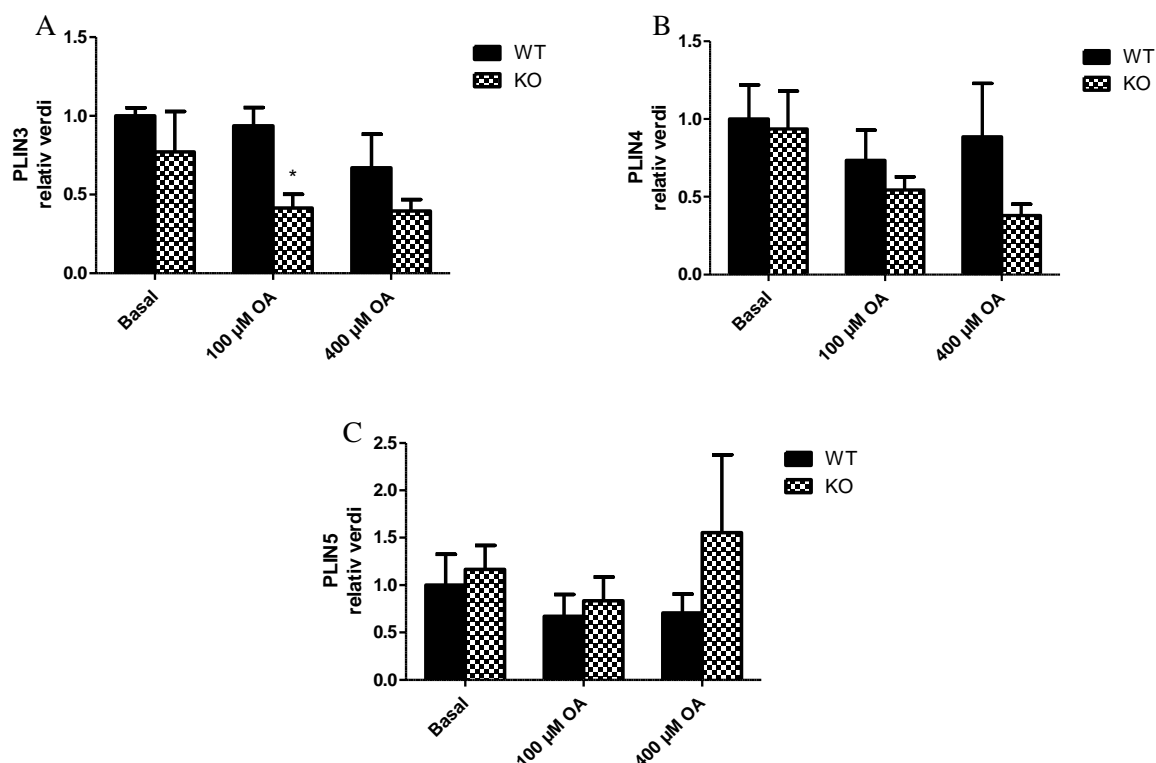


**Figur 36:** Analyse av syreløselige metabolitter (ASM) av [1-<sup>14</sup>C]oljesyre i *PLIN2-WT* og *PLIN2-KO* myotuber ved formerking med 100 µM OA og 400 µM OA. ASM målt etter 24 timers inkubasjon med 100 µM og 400 µM [1-<sup>14</sup>C]oljesyre. Dataene presenteres som gjennomsnitt ± SEM av alle behandlinger pr OA konsentrasjon, n = 1 per donor. Statistiske analyser ble utført ved hjelp av SPSS med linear blandet modell analyse, \*p<0,001 mot WT.

Det var signifikant økt mengde syreløselige metabolitter i medium fra *PLIN2-KO* myotuber sammenlignet med *PLIN2-WT* myotuber (p<0,001). I løpet av 24 timer har det altså vært en høyere β-oksidasjon av oljesyre til syreløselige metabolitter hos *PLIN2-KO* myotuber ved både 100 µM og 400 µM OA (figur 36).

## 3.13 Genekspresjonsstudier (qPCR)

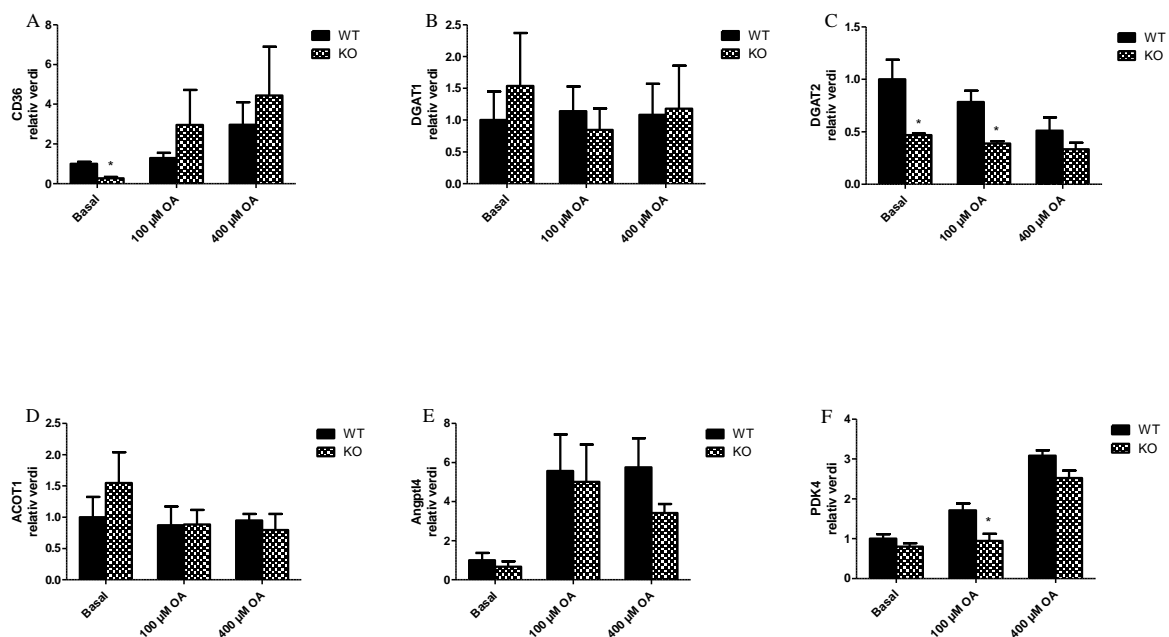
Uttrykk av diverse gener som er viktige for energimetabolismen i celler ble undersøkt i *PLIN2-WT* og *PLIN2-KO* myotuber. Genene som ble undersøkt var PLIN3, PLIN4, PLIN5, CD36, DGAT1, DGAT2, ACOT1, Angptl4, PDK4, CPT1b, CYC1, PGC1α, PGC1β, PPARα og PPARδ.



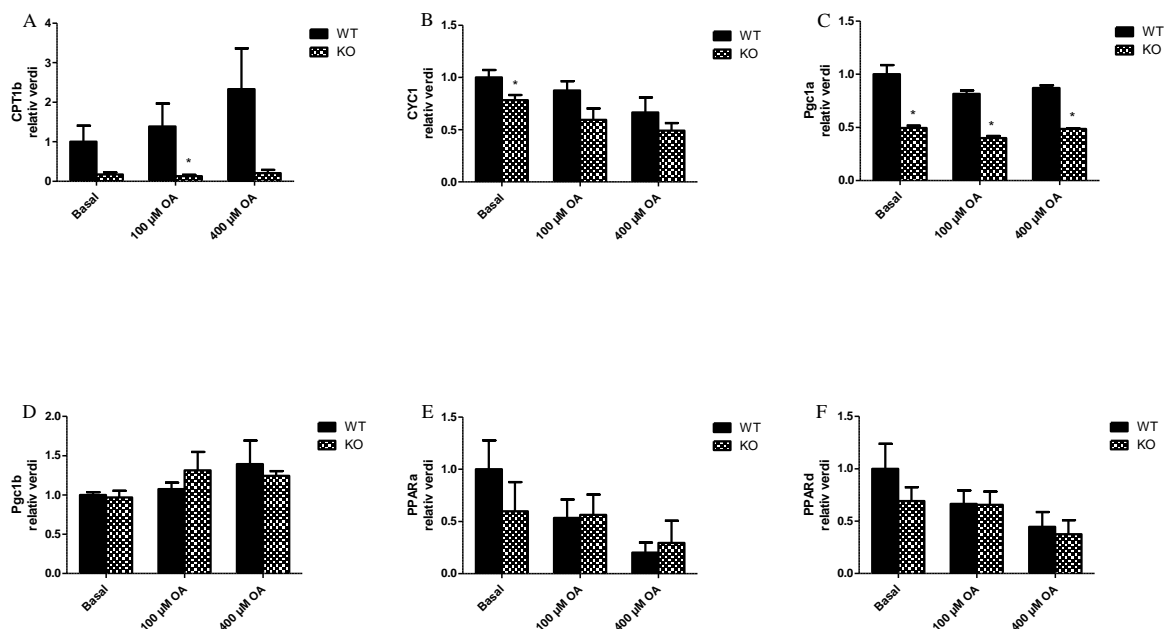
**Figur 37: Uttrykk av PLIN3, PLIN4 og PLIN5 i *PLIN2*-WT og *PLIN2*-KO myotuber ved ulike konsentrasjoner av OA.** Figuren viser uttrykket av PLIN3 (A), PLIN4 (B) og PLIN5 (C) relatert til TBP i myotuber fra *PLIN2*-WT og *PLIN2*-KO for basal og for 24 timers forbehandling med 100  $\mu$ M eller 400  $\mu$ M OA. Data presenteres som gjennomsnitt  $\pm$  SEM for 3 paralleller per donor per behandling, hvor basalverdien for WT er satt til 1, n=2. Statistiske analyser ble utført ved hjelp av tosidig uparet t-test, \*p<0,05 for KO vs. WT.

Det ble ikke observert noe kompensatorisk økning i mRNA-uttrykk av de øvrige PLIN proteinene ved fjerning av PLIN2 proteinet (figur 37). Tvert imot var det signifikant lavere ekspresjon av PLIN3 i *PLIN2*-KO myotuber sammenlignet med *PLIN2*-WT myotuber etter forbehandling med 100  $\mu$ M OA i 24 timer (p=0,005). Det var ingen klare forskjeller i ekspresjon av PLIN4 og PLIN5 mellom donorgruppene.





**Figur 38: Uttrykk av CD36, DGAT1, DGAT2, ACOT1, Angptl4 og PDK4 i *PLIN2*-WT og *PLIN2*-KO myotuber ved ulike konsentrasjoner av OA.** Figuren viser uttrykket av CD36 (A), DGAT1 (B), DGAT2 (C), ACOT1 (D), Angptl4 (E) og PDK4 (F) relatert til TBP i myotuber fra *PLIN2*-WT og *PLIN2*-KO for basal og for 24 timers forbehandling med 100  $\mu$ M eller 400  $\mu$ M OA. Data presenteres som gjennomsnitt  $\pm$  SEM for 3 paralleller per donor per behandling, hvor basalverdien for WT er satt til 1, n=1-3. Statistiske analyser ble utført ved hjelp av tosidig uparet t-test, \*p<0,05 for KO vs. WT.



**Figur 39: Uttrykk av CPT1b, CYC1, PGC1α, PGC1β, PPARα og PPARδ i *PLIN2*-WT og *PLIN2*-KO myotuber ved ulike konsentrasjoner av OA.** Figuren viser uttrykket av CPT1b (A), CYC1 (B), PGC1α (C), PGC1β (D), PPARα (E) og PPARδ (F) relatert til TBP i myotuber fra *PLIN2*-WT og *PLIN2*-KO for basal og for 24 timers forbehandling med 100  $\mu$ M eller 400  $\mu$ M OA. Data presenteres som gjennomsnitt  $\pm$  SEM for 3

paralleller per donor per behandling, hvor basalverdien for WT er satt til 1, n=1-3. Statistiske analyser ble utført ved hjelp av tosidig uparet t-test, \*p<0,05 for KO vs. WT.

Generelt for mange av genene ble det observert en oljesyrerespons ved økende konsentrasjon av OA. Det kan se ut som om det er noe høyere uttrykk av membrantransportøren CD36 i *PLIN2-KO* myotuber sammenlignet med *PLIN2-WT* myotuber ved 100  $\mu$ M og 400  $\mu$ M OA, mens denne ved var signifikant lavere i *PLIN2-KO* myotuber sammenlignet med *PLIN2-WT* myotuber i basalsituasjonen (p=0,0002) (figur 38A). For DGAT2, som er involvert i TAG-syntese, var uttrykket signifikant lavere i *PLIN2-KO* myotuber enn i *PLIN2-WT* myotuber for basal og 100  $\mu$ M OA forbehandling (p=0,018 og p=0,01) (figur 38C). PDK4 viste en tydelig oljesyrerespons, og mRNA-uttrykket av PDK4 for *PLIN2-KO* myotuber lå under verdiene for *PLIN2-WT* myotuber for alle tre behandlinger, hvor forskjellen mellom donorgruppene var signifikant ved forbehandling med 100  $\mu$ M OA (p=0,04) (figur 38F).

For CPT1b, som transporterer fettsyrer inn i mitokondriene for oksidasjon, var uttrykket signifikant lavere i *PLIN2-KO* myotuber enn i *PLIN2-WT* myotuber etter forbehandling med 100  $\mu$ M OA (p=0,046), samt at det var en tendens til lavere uttrykk av CPT1b også ved basal og ved forbehandling med 400  $\mu$ M OA (p=0,061 og p=0,068) (figur 39A). CYC1, som inngår i cellenes elektrontransportkjede, var signifikant lavere i *PLIN2-KO* myotuber enn i *PLIN2-WT* myotuber ved basalsituasjonen (p=0,03) (figur 39B). PGC1 $\alpha$  er en viktig regulator for mitokondriell biogenese, og var signifikant redusert i *PLIN2-KO* myotuber for både basal, 100  $\mu$ M og 400  $\mu$ M OA forbehandling (p<0,005) (figur 39C).

## 4 Diskusjon

PLIN2 proteinet er det lipiddråpeassosierte proteinet som er høyest uttrykt i skjelettmuskel, og det spiller en til nå ikke fullstendig klarlagt rolle i energimetabolismen til myotuber. Det er foreslått at PLIN2 virker på samme måte i skjelettmuskel som perilipin (PLIN1) i fettvev, ved å regulere lipolyse av triglyserider (TAG) til frie fettsyrer (FFA) [11, 31]. Det er vist at PLIN2 kolokaliserer med lipiddråper (LD) i cytosol, og flere studier tyder på at PLIN2 påvirker lagring av fettsyrer som TAG i lipiddråper [25]. I tillegg kan uttrykk av PLIN2 ha en sammenheng med utvikling av insulinresistens i skjelettmuskel, noe som er viktig i forhold til type 2-diabetes og metabolsk syndrom [33, 34]. For å studere PLIN2 proteinets rolle for lipid- og glukosemetabolismen i skjelettmuskel, ble det i denne oppgaven gjort forsøk hvor vi sammenlignet myotuber fra *PLIN2-WT* (villtype) og *PLIN2-KO* (knockout) mus. En slik muscellemodell, hvor genet for et spesifikt protein er fjernet, er en god modell for å studere konsekvensene av at dette proteinet ikke lenger utøver sin funksjon i myotubene.

For å kunne stole på resultatene fra ulike funksjonelle forsøk, må muscellemodellen valideres. Dette gjøres ved å kvantifisere mengde mRNA for PLIN2 som finnes i myotubene, relatert til  $\beta$ -aktin (endogen kontroll), ved hjelp av real-time qPCR. I tidligere forsøk ble det funnet en betydelig mengde mRNA for PLIN2 i alle donorene (WT17, WT2, KO19 og KO4) (figur 12). Med en slik marginal forskjell i genuttrykk av PLIN2, kan det ikke gjøres funksjonelle studier med disse donorene. Myotuber fra nyopprensede celler (avsnitt 2.2.2 og 2.2.3) fra PLIN2 knockout donormus (KO5) ble sådd ut og undersøkt med real-time qPCR. Her ble det funnet at PLIN2 genuttrykket var ca. 100-300 ganger lavere hos KO5 celler enn hos villtypecellene (figur 13). Av de forskjellige KO donorene ble kun KO5 benyttet i videre forsøk, da det er tidligere vist at myoblaste fra mus fremdeles kan differensiere etter minst 100 celledoblinger [53]. Uttrykket av PLIN2 vil være forsvinnende lite i forhold til villtypemyotubene, og denne musemodellen vil kunne bidra til å finne ut mer om PLIN2 proteinets eksakte rolle i energimetabolismen i skjelettmuskel.

### 4.1 Oppsummering av oppgavens hovedfunn

Hovedfunnene i denne masteroppgaven var observasjonene av en lavere fettsyreakkumulering over tid og en høyere oksidasjon av oljesyre (OA) i *PLIN2-KO* myotuber sammenlignet med *PLIN2-WT* myotuber. Oksidasjon av  $^{14}\text{C}$ -OA var høyere hos *PLIN2-KO* myotuber i løpet av

korttids (4 timers) inkubering. Både ufullstendig oksidasjon til syreløselige metabolitter (figur 25A) og fullstendig oksidasjon til CO<sub>2</sub> (figur 18A) var økt, altså var den totale oksidasjonen av OA økt ved fravær av PLIN2 (figur 25B). Det var ingen forskjell i mengde akkumulert OA mellom donortypene etter 4 timer (figur 18B), men et høyere totalt OA-opptak i *PLIN2-KO* myotuber, mest sannsynlig grunnet den forhøyede oksidasjonen (figur 18C). Studier av mer kronisk OA akkumulering over 24 timer ved SPA metoden viste en økende forskjell i akkumulering av OA mellom *PLIN2-KO* og *PLIN2-WT* myotuber over tid (figur 26), hvor det var en tydelig redusert akkumulering av OA hos *PLIN2-KO* myotuber etter 24 timer (figur 27). Dataene fra SPA støttes av data for lipidakkumulering (målt ved lipidfiltrering), som i likhet med SPA forsøk viser en redusert mengde akkumulert OA i lipider hos *PLIN2-KO* myotuber enn i *PLIN2-WT* myotuber (figur 33). Data fra live cell imaging viser også et lavere antall lipiddråper (LD) i myotuber fra *PLIN2-KO* mus (figur 17). Det var også en signifikant redusert akkumulering av OA i *PLIN2-KO* myotuber etter inkubering av cellene med 400 µM <sup>14</sup>C-OA i 24 timer sammenlignet med *PLIN2-WT* myotuber, men ikke ved 100 µM OA (figur 35B). Formerkingen viste også økt oksidasjon av OA i *PLIN2-KO* myotuber, og forskjellen mellom disse cellene og *PLIN2-WT* myotubene var enda tydeligere etter en slik formerking i 24 timer etterfulgt av 4 timers trapping av CO<sub>2</sub> (figur 35A) enn etter kun 4 timers oksidasjonsforsøk (uten forbehandling av cellene med fettsyre). Forskjellen i fettsyreoksidasjon var signifikante ved begge konsentrasjoner av OA, både ved måling av ASM og CO<sub>2</sub>. (figur 36).

Det ble også funnet signifikante forskjeller i glukosemetabolismen, hvor fravær av PLIN2 førte til redusert opptak, akkumulering og oksidasjon av glukose i *PLIN2-KO* myotubene (figur 19). Dette viser at også glukosemetabolismen i skjelettmuskel kan påvirkes av PLIN2 uttrykket.

Oksidasjon av OA og glukose ble summert for å få et mål på den totale oksidasjonen i myotubene (figur 20). Myotuber fra *PLIN2-KO* mus viste en signifikant høyere oksidativ utnyttelse, og en større andel av den totale substratoksidasjonen gikk til å oksidere OA. Altså ble det oksidert mer OA i myotuber som manglet PLIN2 proteinet, og dette gikk på bekostning av oksidering av glukose i disse cellene.

Tilsetning av OA akutt til cellene (over 4 timer) førte til lavere glukoseoksidasjon hos begge donorgruppene. I tillegg var det signifikant forskjell i hvor stor grad oljesyre reduserte

oksidasjon av glukose mellom *PLIN2-KO* og *PLIN2-WT* myotuber, og effekten av å tilsette OA var størst hos *PLIN2-KO* myotuber (figur 21B). Tilsetning av glukose akutt hadde imidlertid mindre effekt på oljesyreoksidasjonen, og kun *PLIN2-WT* myotuber fikk redusert oksidasjon av OA (figur 21A).

Begge donortypene responderte godt på tilsetning av den mitokondrielle avkobleren FCCP, med signifikant økt oksidasjon av både OA og glukose. Forskjellen mellom myotubene med og uten PLIN2 proteinet kom tydeligere frem ved at *PLIN2-KO* myotubene hadde en større økning i oljesyreoksidasjon enn *PLIN2-WT* myotubene, og igjen medfører dette redusert glukoseoksidasjon, som er lavere sammenlignet med *PLIN2-WT* myotuber i nærvær av FCCP (figur 23).

Aktivering av PPAR $\delta$  ved bruk av agonisten GW501516 økte signifikant oksidasjon og totalopptak av OA i både *PLIN2-WT* og *PLIN2-KO* myotuber, men det var ingen forskjeller mellom donorgruppene (figur 22A, B). Glukoseopptaket var signifikant lavere hos *PLIN2-WT* myotuber sammenlignet med basal etter GW501516, og det var også en tendens til lavere glukoseoksidasjon. Dette ble ikke observert i *PLIN2-KO* myotuber (figur 22C, D).

Når lipolyse av OA-merkede lipider ble justert for hvor mye oljesyre som var akkumulert i myotubene ved starten av lipolysemålingene, var det ingen klare forskjeller mellom *PLIN2-WT* og *PLIN2-KO* myotuber (figur 30). Likevel kunne det se ut som at lipolyse i *PLIN2-KO* myotuber lå konsekvent høyere enn *PLIN2-WT* myotuber ved høyere konsentrasjoner av OA (figur 31).

Genekspresjonsstudier viste tydelig redusert mRNA-uttrykk av DGAT2, CPT1b, CYC1 og PGC1 $\alpha$  i *PLIN2-KO* myotuber.

## 4.2 Betydning av PLIN2 for lipidmetabolisme i skjelettmuskel

Resultater i denne oppgaven viste lavere akkumulering og høyere oksidasjon av OA ved fravær av PLIN2 i myotuber. Dette tyder på at cellene ved mangel på PLIN2-proteinet ikke får lagret FFA som TAG i LD like effektivt som celler som uttrykker dette proteinet, og FFA som tas opp i cellen går da i stedet til oksidasjon i mitokondriene.

Observasjonene om at mangel på PLIN2 gir lavere mengde OA akkumulert i myotubene over tid samsvarer med funnene gjort av Bosma et al. [35], hvor knock-down (KD) av PLIN2 i C2C12 musmuskelceller forhindret intramyocellulær lagring av TAG. I den studien ble lagring av lipider målt etter 3 timers inkubering med  $^{14}\text{C}$ -palmitat, noe som resulterte i signifikant lavere mengde totale nøytrale lipider akkumulert i *PLIN2*-KD myotuber. Reduksjonen kom av redusert mengde TAG, mens mengden FFA som ble inkorporert i fosfolipider eller som DAG var signifikant høyere i *PLIN2*-KD sammenlignet med kontrollmyotuber [35].

I denne oppgaven ble total mengde OA som befinner seg i myotubene etter 4 timers inkubering målt (CA, celleassosiert radioaktivitet), og det ble ikke funnet noen forskjell i CA mellom donorgruppene (figur 18B). Denne metoden skiller imidlertid ikke mellom de ulike måtene FFA kan lagres på (FFA kan inngå i ulike lipidklasser). Derfor vil FFA i form av for eksempel fosfolipider og DAG kunne påvirke resultatet, og radioaktiviteten som registreres vil derfor ikke kun være FFA som har blitt lagret som TAG i LD. Det er også mulig at akkumulering over 4 timer er for kort tid for forskjeller i akkumulering av OA mellom *PLIN2-KO* og *PLIN2-WT* å komme tydelig frem. Det er mulig at *PLIN2-KO* myotuber i begynnelsen klarer å kompensere for sin manglende evne til å lagre OA i LD ved i stedet å lagre fettsyren som fosfolipider, DAG og ceramider, som vist i [35]. Når evnen til alternativ lagring med tiden blir mett, får det utslag i en redusert mengde OA-merkede lipider i *PLIN2-KO* sammenlignet med *PLIN2-WT* (figur 27, figur 35B). Det ble også benyttet en mer spesifikk metode som måler mengde nøytrale lipider (lipidfiltrasjon), og denne viste tydelig lavere mengde nøytrale lipider akkumulert i *PLIN2-KO* enn i *PLIN2-WT* myotuber (figur 33). Ved live imaging var det kun LD (farget av Bodipy) som ble analysert, og FFA i andre former enn nøytrale lipider vil ikke bli farget. Myotubene ble her inkubert med oljesyre i 24 timer. Dette er også det forsøket i denne studien hvor det er tydeligst forskjell mellom lipidakkumulering i *PLIN2-WT* og *PLIN2-KO*, og man ser tydelig fra bildene (figur 16) og grafen (figur 17A) at *PLIN2-KO* myotuber ikke klarer å lage like mange LD som *PLIN2-WT* myotuber. Det var signifikant lavere antall LD per kjerne i *PLIN2-KO* myotuber. Det er altså tydelig ut fra resultatene at hypotesen om at PLIN2 fremmer lagring av IMCL stemmer, men det er fortsatt uklart hvilke konsekvenser dette har for energimetabolismen og funksjonaliteten til myotubene, for skjelettmuskel *in vivo* og derved også for resten av kroppen. Det ser ikke ut til å skje en kompensatorisk økt ekspresjon av PLIN3 i muskelceller (figur 37A), [35].

Bosma et al. viste at C2C12 myotuber som ble inkubert med 200  $\mu$ M OA hadde en jevn økning av uttrykket av PLIN2 over tid, fra 0-24 timer etter tilsetning av OA til cellene [35]. Dette er også en mulig forklaring på hvorfor forskjellene mellom *PLIN2-WT* og *PLIN2-KO* myotuber ikke kommer veldig klart frem før etter 24 timers inkubering med OA, da *PLIN2-WT* myotubene etter 24 timer har fått oppregulert PLIN2 proteinet, mens *PLIN2-KO* myotubene fremdeles mangler det. *PLIN2-WT* myotubene har altså lavere nivåer av PLIN2 i utgangspunktet, og forskjellene mellom dem og *PLIN2-KO* myotubenes manglende PLIN2 vil ikke være like tydelige etter kort tid.

Selv om myotubene ikke klarer å danne LD i like stor grad ved fravær av PLIN2 proteinet, ble det i denne studien ikke funnet et redusert opptak av oljesyre i *PLIN2-KO* myotuber. Tvert imot var totalopptaket av OA i *PLIN2-KO* myotuber økt i forhold til *PLIN2-WT* myotuber etter 4 timers inkubering (figur 18C), mens det etter 24 timers formerking med OA ikke var noen tydelige forskjeller mellom donorgruppene (figur 34C). Det faktum at FFA kan lagres i andre lipidklasser enn TAG ved mangel på PLIN2, gjør ikke rede for hele forskjellen i akkumulering etter 24 timer, hvor cellene altså tar opp like mye FFA, men *PLIN2-KO* myotuber lagrer mindre. Differansen kan forklares med økt oksidasjon av FFA i *PLIN2-KO* myotuber sammenlignet med *PLIN2-WT* myotuber. Siden cellene ikke klarer å lagre fettsyrene i nøytrale lipider, blir mer substrat tilgjengelig for  $\beta$ -oksidasjon av OA til acetyl-CoA. Dette vises ved økt produksjon av  $\text{CO}_2$  fra etterfølgende TCA syklus i *PLIN2-KO* myotuber både etter 4 og 24 timers inkubering med OA (figurer 18A og 35A). Relativt sett mer av oljesyren som tas opp i cellen blir oksidert i *PLIN2-KO* myotuber (fraksjonell oksidasjon, figur 34D). Selv om  $\beta$ -oksidasjonen øker for å kompensere for den økte mengden FFA i cellene, klarer muligens ikke TCA syklus og elektrontransportkjeden (ETC) å øke forbruket av acetyl-CoA i like stor grad, noe som har blitt beskrevet av Koves et al. ved økt FFA opptak i muskel [18] (avsnitt 1.3.4). Resultatet kan være opphoping av acetyl-CoA, og dannelsen av metabolske biprodukter fra denne, som acylkarnitiner. Dette ble undersøkt ved å måle dannelsen av syreløselige metabolitter (ASM) fra cellene. Resultatene viste signifikant økt mengde ASM, et tegn på ufullstendig  $\beta$ -oksidasjon, i mediet hos *PLIN2-KO* myotuber sammenlignet med *PLIN2-WT* myotuber både etter 4 timers oksidasjonsforsøk (figur 25A), etter fullført SPA forsøk (figur 28) og etter 24 timers formerking med  $^{14}\text{C}$ -OA (figur 36). Også Bosma et al. observerte tendens til økt ufullstendig fettsyreoksidasjon (ASM) av  $^{14}\text{C}$ -

palmitat i deres *PLIN2*-KD celler sammenlignet med kontrollmyotuber, noe som videre gav en tendens til økt total oksidasjon, men det ble ikke observert noen signifikante forskjeller i oksidasjon av palmitat til CO<sub>2</sub> mellom de to cellegruppene i deres studie [35]. Det er mulig at forskjellene ikke kommer like godt frem ved KD av *PLIN2* proteinet, men at det er nødvendig å fjerne *PLIN2* fullstendig ved KO for at oksidasjonen skal påvirkes. Likevel peker deres resultater i samme retning, og studien viser også funn av kompensatorisk økt ekspresjon av gener som er involvert i mitokondriell funksjon, blant annet var *PGC1α* økt ved KD av *PLIN2*. Redusert *PLIN2* førte også til økt proteinkspresjon av OXPHOS komplekser [35], som er et tegn på økt oksidasjon i cellene.

Ved tilsetning av mitokondriell avkobler (FCCP) akutt til myotubene under substratoksidasjonsforsøk, vil den maksimale oksidative kapasiteten til mitokondriene bli uttrykt. FCCP frikobler mitokondriene og gjør at ETC ikke begrenses av energibehovet til cellen, og β-oksidasjonsproduktene går videre til TCA syklus og inn i ETC i stedet for å hopes opp og muligens skape mitokondrielt stress. Dette fører til at det blir produsert mindre ASM i begge donorgruppene (figur 25A), men fullstendig oksidasjon målt som mengde CO<sub>2</sub> frigjort vil øke tilsvarende, noe som gir en økt total fettsyreoksidasjon ved tilsetning av FCCP til cellene (figur 25B). Oksidasjonen av OA øker i større grad hos *PLIN2-KO* myotuber enn hos *PLIN2-WT* myotuber (figur 23A), noe som kan forklares ved at myotubene som mangler *PLIN2* har et større press mot fettsyreoksidasjon, på grunn av den reduserte evnen til å lagre fettsyrene i lipiddråper. Når FCCP gjør at oksidasjonsveien ikke lenger hemmes, økes oksidasjonen i KO-myotubene signifikant mer enn i WT-cellene. *PLIN2* vil også mest sannsynlig aktivere systemer som øker cellens totale oksidative kapasitet.

Den økte fettsyreoksidasjonen i *PLIN2-KO* myotuber sammenlignet med *PLIN2-WT* myotuber kan være med på å forklare økningen vi så i OA-opptak (figur 18C), ved at økt oljesyreoksidasjon driver opptaksprosessen gjennom å øke gradienten over cellemembranen. Bosma et al. fant økt uttrykk av CD36 i *PLIN2-KD* myotuber [35] som er en viktig transportør i cellemembranen til myotubene. Økt uttrykk av CD36 vil være med på å øke transporten av OA over cellemembranen, og kan føre til et økt opptak av FFA. Resultater fra genekspresjonsstudier i denne oppgaven varierer fra resultatene til Bosma et al. I *PLIN2-KO* myotuber var uttrykket av fettsyretransportproteinet CD36 signifikant lavere ved basalverdier, noe som indikerer et redusert opptak av OA i cellene (figur 38A). Ved forbehandling med OA i 24 timer øker uttrykket av CD36 i begge donorgruppene, og bildet snur mot høyere uttrykk i



*PLIN2-KO* myotuber sammenlignet med *PLIN2-WT* myotuber. Det er nødvendig med flere forsøk for å avklare om CD36 er redusert eller økt i *PLIN2-KO* myotuber, og om dette avhenger av behandling med OA. Det kan tenkes at redusert uttrykk av CD36 er *KO*-cellens reaksjon på forstyrret lipidlagring og lipidmetabolisme, og at den prøver å kompensere ved å nedregulere membrantransportere i et forsøk på å redusere opptaket av FFA og dermed redusere mengden lipider som cellen må ta hånd om på andre måter enn ved lagring i LD.

Funnene støtter en viktig rolle for PLIN2 i lipiddråpehomeostasen og lipidmetabolismen, men mekanismen for hvordan dette proteinet promoterer økt lipidlagring er ikke fullstendig kartlagt.

Det er vist at PLIN2 oppreguleres av GW501516 gjennom aktivering av PPAR $\delta$  [54]. Oppregulering av PLIN2 vil da kun skje i *PLIN2-WT* myotuber, som fremdeles har PLIN2 genet intakt. Forbehandling med GW501516 i *PLIN2-WT* myotuber førte til redusert opptak og oksidasjon av glukose, noe som stemmer med resultater fra Feng et al. på humane myotuber [54], men slik forbehandling påvirket ikke glukosemetabolismen i *PLIN2-KO* myotuber. Det kan derfor tenkes at økt ekspresjon av PLIN2 ved PPAR $\delta$  aktivering er faktoren som påvirker glukosemetabolismen i cellene. Feng et al. viser at aktivering av PPAR $\delta$  gjør at energisubstratforbruket «switcher» fra glukose til fettsyrer, med økt fettsyreoksidasjon og redusert glukoseoksidasjon. Effekten på glukose ble i denne studien kun observert i *PLIN2-WT* myotuber, mens begge donorgruppene fikk oppregulert fettsyreoksidasjonen (figur 22). Fra forsøkene med FCCP vet vi at *PLIN2-KO* myotuber har en større maksimal oksidativ kapasitet enn *PLIN2-WT* myotuber, og det kan tenkes at disse cellenes økte oksidative kapasitet gjør at GW501516 ikke klarer å redusere glukosemetabolismen i *PLIN2-KO* myotuber, men at de oksiderer og dermed tar opp like mye glukose som før.

Flere artikler har data som tyder på at PLIN2 spiller en rolle i regulering av TAG hydrolyse til FFA [31, 32], og hypotesen er at *PLIN2-KO* vil føre til at denne regulatoriske mekanismen som vanligvis hemmer kontakt mellom lipaser og LD bortfaller, og dermed vil lipolysen kunne øke. Resultater i denne studien tyder på at lipolysen primært avhenger av mengde lipider som er akkumulert i cellen, og at det er akkumuleringen av OA som varierer mellom de to celletypene. *PLIN2-KO* myotuber måtte tilsettes en høyere konsentrasjon av OA enn *PLIN2-WT* myotuber for å komme opp i samme mengde OA akkumulert i cellene ved start av lipolyseforsøket. Lipolyse angitt som nmol/mg var ved disse konsentrasjonene omtrent lik

(vedlegg 6.8). Lipolyse relatert til mengde OA i cellen (celleassosiert radioaktivitet ved tid 0) gir derfor et bedre bilde, og viste ingen signifikante forskjeller mellom donorgruppene. Likevel ligger prosentvis lipolyse av OA ved høyere konsentrasjoner (fra ca. 400  $\mu$ M OA) høyere for *PLIN2-KO* myotuber enn for *PLIN2-WT* myotuber, noe som stemmer med funn fra andre studier som viser at PLIN2 kan hemme lipolyse [31]. Det er nødvendig med flere forsøk på lipolyse for å kunne si noe sikkert om PLIN2s rolle i denne prosessen i myotuber fra mus.

## 4.3 Betydning av PLIN2 for glukosemetabolisme i skjelettmuskel

Når fettsyreoksidasjonen i celler øker, kan dette føre til nedregulering av opptak og oksidasjon av glukose. Randle et al. introduserte mekanismen for hvordan økt mengde acetyl-CoA og citrat fra fettsyreoksidasjon hemmer glukoseoksidasjon, da hovedsakelig ved å inhibere omdanningen av pyruvat til acetyl-CoA via hemming av PDH [41]. Også opptak av glukose via GLUT4 reduseres ved økt FFA i cellen. Dette kalles Randle sykklus, og er en mulig forklaring for observasjonene av redusert opptak, akkumulering og oksidasjon av glukose i *PLIN2-KO* myotuber sammenlignet med *PLIN2-WT* myotuber (figur 19). *PLIN2-KO* myotuber har redusert lagring og økt oksidasjon av OA, noe som gjør at mengde oksidasjonsprodukter fra FFA vil være høyere i disse cellene. Dette vil igjen kunne hemme opptak og oksidasjon av glukose via mekanismer beskrevet av Randle et al. Oljesyrems hemmende effekt på glukoseoksidasjon kommer enda tydeligere frem ved tilsetning av 100  $\mu$ M OA akutt til glukoseoksidasjonsforsøk (figur 21B). Oksidasjonen av glukose blir sterkt hemmet ved tilstedeværelse av OA, og oksidasjonen blir signifikant mer redusert i *PLIN2-KO* myotuber enn i *PLIN2-WT* myotuber. Grunnen er sannsynligvis at mer av den tilsatte oljesyra blir lagret som LD i *PLIN2-WT* myotuber, mens i *PLIN2-KO* myotuber går det aller meste av OA til oksidasjon i mitokondriene, hvor glukosemetabolismen hemmes.

Ved tilsetning av den mitokondrielle avkobleren FCCP øker oksidasjonen av glukose mer i *PLIN2-WT* myotuber enn i *PLIN2-KO* myotuber (figur 23B). Dette må ses i sammenheng med effektene FCCP har på oljesyreoksidasjon, hvor oksidasjonen øker mer i *PLIN2-KO* myotuber. Igjen viser resultatene at økt oksidasjon av OA i *PLIN2-KO* myotuber går på bekostning av glukoseoksidasjonen, og ved å legge sammen total substratoksidasjon for donorgruppene er det tydelig at en mindre andel av totaloksidasjonen brukes til å oksidere glukose i *PLIN2-KO* myotuber (figur 20).

Bosma et al. målte opptak av deoksyglukose i C2C12-celler, og fant ingen forskjeller i glukoseopptak mellom *PLIN2*-KD myotuber og kontrollmyotuber. Heller ikke fosforylering av AKT (mål på insulinsignalerings) var påvirket etter knock-down av *PLIN2*. De studerte også effekten av *PLIN2* overekspresjon på insulinresistens induisert av en fettrik diett hos rotter. Dette ble undersøkt ved å måle opptak av  $^3\text{H}$ -merket deoksyglukose i muskel etter intravenøs administrering av denne. På tross av økt IMCL ble det ikke funnet lavere insulinsensitivitet hos rottene med overuttrykk av *PLIN2* proteinet, tvert imot var opptaket av deoksyglukose signifikant økt med 11,1 % i benmuskulaturen til disse rottene sammenlignet med kontroll [35]. Denne økningen stemmer overens med resultatene om redusert glukoseopptak ved *PLIN2* KO, men det er mulig *PLIN2* KD ikke er tilstrekkelig for å få frem forskjellene i glukosemetabolismen som vi ser i *PLIN2-KO* myotuber.

## 4.4 *PLIN2*s påvirkning av genekspresjon i skjelettmuskel

Resultatene fra qPCR forsøk viste generelt en nedregulering av gener for proteiner som er involvert i mitokondrienes funksjon og oksidasjon av fettsyrer, med lavere nivåer av *CPT1b*, *PGC1 $\alpha$*  og *CYC1* i *PLIN2-KO* myotuber sammenlignet med *PLIN2-WT* myotuber. Det er mulig at cellen reagerer på den økte oksidasjonen av OA med å nedregulere gener som påvirker denne metabolske veien, i et forsøk på å begrense lipidmetabolismen.

Likevel sier ikke mRNA-ekspresjon noe om uttrykket av disse genene på proteinnivå, og det kan være interessant å undersøke senere hvordan proteinuttrykket til gener som regulerer mitokondriell oksidasjon påvirkes når *PLIN2* genet er fjernet.

Det er funnet at *DGAT2* spiller en større rolle i syntetisering av TAG enn *DGAT1*, og at den står for hoveddelen av TAG-syntese i celler [55]. Det er som forventet lavere mRNA-uttrykk av *DGAT2* i *PLIN2-KO* myotuber enn i *PLIN2-WT* myotuber, mens nivået av *DGAT1* ikke påvirkes. Signifikant redusert *DGAT2* i cellen kan forklares med at *PLIN2-KO* myotuber ikke effektivt klarer å lagre TAG i LD, og derved nedreguleres syntese av TAG ved å redusere nivået av *DGAT2*.

*PDK4* hemmer pyruvat dehydrogenase-komplekset i mitokondriene, og hemmer dermed omdannelsen av pyruvat til acetyl-CoA (avsnitt 1.5.1). *PDK4*s funksjon er å spare på glukose ved å nedregulere glukosemetabolismen [56]. Fordi vi observerte redusert opptak og

oksidasjon av glukose i *PLIN2-KO* myotuber ved de funksjonelle studiene, var det forventet at PDK4 kunne være økt i disse cellene. Likevel ble det i denne oppgaven observert redusert mRNA-uttrykk av PDK4 i *PLIN2-KO* myotuber sammenlignet med *PLIN2-WT* myotuber. Dette indikerer at det er den økte substrattilgangen fra fettsyremetabolismen som nedregulerer glukosemetabolismen ved Randle syklus mekanismer, og at økt lipidmetabolisme ved mangel på PLIN2 proteinet ikke regulerer glukosemetabolismen på gennivå via endring i nivået av PDK4.

## 4.5 Veien videre

Videre studier er nødvendig for å avklare PLIN2 proteinets funksjon i skjelettmuskel. Det har blitt vist at forskjellene mellom *PLIN2-WT* og *PLIN2-KO* myotuber er tydeligere over tid, og det ville vært ønskelig med flere forsøk med formerking eller forbehandling av myotubene med fettsyrer. I tillegg ville det være interessant å vite mer spesifikt hva som skjer med fettsyrene i cellen ved å undersøke lipiddistribusjonen (for eksempel hvor mye av  $^{14}\text{C}$ -OA befinner seg i ulike lipidklasser som TAG, DAG, FFA, ceramider og fosfolipider).

Dersom det stemmer at en større andel av lipidene danner fettsyremetabolitter som DAG og ceramider i *PLIN2-KO* myotuber, ville det være interessant å undersøke hvordan mangel på PLIN2 påvirker insulinresponsen i cellene, da man tror at økte nivåer av DAG og ceramider, i stedet for lagring som TAG i LD, kan gi lipotoksisitet og føre til insulinresistens og således redusere glukosemetabolismen ved en slik mekanisme.

## 5 Konklusjon

Eksakt mekanisme for hvordan PLIN2 proteinet påvirker energimetabolismen i skjelettmuskulatur er fremdeles uklar, men resultatene i denne oppgaven bidrar til å belyse PLIN2s rolle for lipid- og glukosemetabolisme i skjelettmuskel. Det ble vist at PLIN2 var uttrykt i myotuber fra villtype (WT) mus, men fraværende i myotuber fra knock-out (KO) mus. Det ble observert lavere akkumulering av oljesyre over tid, samt høyere oksidasjon i *PLIN2-KO* myotuber sammenlignet med *PLIN2-WT* myotuber. Økt OA metabolisme kan være et resultat av redusert kapasitet til å lagre fettsyrer (OA) som triglyserider (TAG) i lipiddråper (LD), slik at en større andel OA går til oksidasjon og energiproduksjon i mitokondriene. Til tross for økt total oksidativ kapasitet, gikk den økte oljesyreoksidasjonen på bekostning av glukosemetabolismen, og opptak og oksidasjon av glukose ble redusert i *PLIN2-KO* myotuber.

Mangel på PLIN2 påvirker mRNA-uttrykket av flere gener som spiller en rolle i blant annet lipidopptak, mitokondriell funksjon/oksidasjon av OA, samt syntese av TAG.

# Litteraturliste

1. Eckel, R.H., S.M. Grundy, and P.Z. Zimmet, *The metabolic syndrome*. Lancet, 2005. **365**(9468): p. 1415-1428.
2. IDF, *The International Diabetes Federation Consensus worldwide definition of the Metabolic Syndrome*, 2006.
3. Després, J.P., *Is visceral obesity the cause of the metabolic syndrome?* Annals of Medicine, 2006. **38**(1): p. 52-63.
4. Wajchenberg, B.L., *Subcutaneous and visceral adipose tissue: Their relation to the metabolic syndrome*. Endocrine Reviews, 2000. **21**(6): p. 697-738.
5. Khan, A. and J. Pessin, *Insulin regulation of glucose uptake: A complex interplay of intracellular signalling pathways*. Diabetologia, 2002. **45**(11): p. 1475-1483.
6. Chow, L., A. From, and E. Seaquist, *Skeletal muscle insulin resistance: the interplay of local lipid excess and mitochondrial dysfunction*. Metabolism: Clinical and Experimental, 2010. **59**(1): p. 70-85.
7. Martins, A.R., et al., *Mechanisms underlying skeletal muscle insulin resistance induced by fatty acids: Importance of the mitochondrial function*. Lipids in Health and Disease, 2012. **11**.
8. Watt, M.J., *Storing up trouble: Does accumulation of intramyocellular triglyceride protect skeletal muscle from insulin resistance?* Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology, 2009. **36**(1): p. 5-11.
9. Timmers, S., P. Schrauwen, and J. de Vogel, *Muscular diacylglycerol metabolism and insulin resistance*. Physiology and Behavior, 2008. **94**(2): p. 242-251.
10. Dubé, J.J., et al., *Exercise-induced alterations in intramyocellular lipids and insulin resistance: The athlete's paradox revisited*. American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism, 2008. **294**(5): p. E882-E888.
11. Meex, R.C.R., P. Schrauwen, and M.K.C. Hesselink, *Modulation of myocellular fat stores: Lipid droplet dynamics in health and disease*. American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology, 2009. **297**(4): p. R913-R924.
12. Koonen, D.P.Y., et al., *Long-chain fatty acid uptake and FAT/CD36 translocation in heart and skeletal muscle*. Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids, 2005. **1736**(3): p. 163-180.
13. Holloway, G.P., et al., *Contribution of FAT/CD36 to the regulation of skeletal muscle fatty acid oxidation: An overview*. Acta Physiologica, 2008. **194**(4): p. 293-309.
14. Gimeno, R.E., *Fatty acid transport proteins*. Current Opinion in Lipidology, 2007. **18**(3): p. 271-276.
15. Aas, V., et al., *Lipid metabolism in human skeletal muscle cells: Effects of palmitate and chronic hyperglycaemia*. Acta Physiologica Scandinavica, 2005. **183**(1): p. 31-41.
16. Zhang, L., et al., *Role of fatty acid uptake and fatty acid  $\beta$ -oxidation in mediating insulin resistance in heart and skeletal muscle*. Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids, 2010. **1801**(1): p. 1-22.
17. Alberts, B., D. Bray, K. Hopkin, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, og P. Walter, *How cells obtain energy from food, Essential cell biology*. 2004: Garland Science. s. 427-445.
18. Koves, T.R., et al., *Mitochondrial Overload and Incomplete Fatty Acid Oxidation Contribute to Skeletal Muscle Insulin Resistance*. Cell Metabolism, 2008. **7**(1): p. 45-56.
19. Wang, S., et al., *Lipolysis and the integrated physiology of lipid energy metabolism*. Molecular Genetics and Metabolism, 2008. **95**(3): p. 117-126.

20. McIntosh, A.L., et al., *Direct interaction of Plin2 with lipids on the surface of lipid droplets: A live cell FRET analysis*. American Journal of Physiology - Cell Physiology, 2012. **303**(7): p. C728-C742.
21. Ahmadian, M., Y. Wang, and H.S. Sul, *Lipolysis in adipocytes*. International Journal of Biochemistry and Cell Biology, 2010. **42**(5): p. 555-559.
22. Thiele, C. and J. Spandl, *Cell biology of lipid droplets*. Current Opinion in Cell Biology, 2008. **20**(4): p. 378-385.
23. Walther, T.C. and R.V. Farese, *Lipid droplets and cellular lipid metabolism*, 2012. p. 687-714.
24. Brasaemle, D.L., *The perilipin family of structural lipid droplet proteins: Stabilization of lipid droplets and control of lipolysis*. Journal of Lipid Research, 2007. **48**(12): p. 2547-2559.
25. Bickel, P.E., J.T. Tansey, and M.A. Welte, *PAT proteins, an ancient family of lipid droplet proteins that regulate cellular lipid stores*. Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids, 2009. **1791**(6): p. 419-440.
26. Peters, S.J., et al., *Perilipin family (PLIN) proteins in human skeletal muscle: The effect of sex, obesity, and endurance training*. Applied Physiology, Nutrition and Metabolism, 2012. **37**(4): p. 724-735.
27. Heid, H.W., et al., *Adipophilin is a specific marker of lipid accumulation in diverse cell types and diseases*. Cell and Tissue Research, 1998. **294**(2): p. 309-321.
28. Minnaard, R., et al., *Adipocyte differentiation-related protein and OXPAT in rat and human skeletal muscle: Involvement in lipid accumulation and type 2 diabetes mellitus*. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 2009. **94**(10): p. 4077-4085.
29. Mishra, R., et al., *Adipose differentiation-related protein and regulators of lipid homeostasis identified by gene expression profiling in the murine db/db diabetic kidney*. American Journal of Physiology - Renal Physiology, 2004. **286**(5 55-5): p. F913-F921.
30. Tansey, J.T., et al., *Perilipin ablation results in a lean mouse with aberrant adipocyte lipolysis, enhanced leptin production, and resistance to diet-induced obesity*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2001. **98**(11): p. 6494-6499.
31. Listenberger, L.L., et al., *Adipocyte differentiation-related protein reduces the lipid droplet association of adipose triglyceride lipase and slows triacylglycerol turnover*. Journal of Lipid Research, 2007. **48**(12): p. 2751-2761.
32. Sapiro, J.M., et al., *Hepatic triacylglycerol hydrolysis regulates peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  activity*. Journal of Lipid Research, 2009. **50**(8): p. 1621-1629.
33. Phillips, S.A., et al., *Adipocyte differentiation-related protein in human skeletal muscle: Relationship to insulin sensitivity*. Obesity Research, 2005. **13**(8): p. 1321-1329.
34. Coen, P.M., et al., *Insulin resistance is associated with higher intramyocellular triglycerides in type I but not type II myocytes concomitant with higher ceramide content*. Diabetes, 2010. **59**(1): p. 80-88.
35. Bosma, M., et al., *Perilipin 2 improves insulin sensitivity in skeletal muscle despite elevated intramuscular lipid levels*. Diabetes, 2012. **61**(11): p. 2679-2690.
36. Ehrenborg, E. and A. Krook, *Regulation of skeletal muscle physiology and metabolism by peroxisome proliferator-activated receptor  $\delta$* . Pharmacological Reviews, 2009. **61**(3): p. 373-393.

37. Seedorf, U. and J. Aberle, *Emerging roles of PPAR $\delta$  in metabolism*. Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids, 2007. **1771**(9): p. 1125-1131.
38. Yoon, M., *The role of PPAR $\alpha$  in lipid metabolism and obesity: Focusing on the effects of estrogen on PPAR $\alpha$  actions*. Pharmacological Research, 2009. **60**(3): p. 151-159.
39. Sinacore, D.R. and E.A. Gulve, *The role of skeletal muscle in glucose transport, glucose homeostasis, and insulin resistance: Implications for physical therapy*. Physical Therapy, 1993. **73**(12): p. 878-891.
40. Hue, L. and H. Taegtmeyer, *The Randle cycle revisited: A new head for an old hat*. American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism, 2009. **297**(3): p. E578-E591.
41. Randle, P.J., et al., *THE GLUCOSE FATTY-ACID CYCLE ITS ROLE IN INSULIN SENSITIVITY AND THE METABOLIC DISTURBANCES OF DIABETES MELLITUS*. The Lancet, 1963. **281**(7285): p. 785-789.
42. Sidossis, L.S. and R.R. Wolfe, *Glucose and insulin-induced inhibition of fatty acid oxidation: The glucose-fatty acid cycle reversed*. American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism, 1996. **270**(4 33-4): p. E733-E738.
43. Dressel, U., et al., *The Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\beta/\delta$  Agonist, GW501516, Regulates the Expression of Genes Involved in Lipid Catabolism and Energy Uncoupling in Skeletal Muscle Cells*. Molecular Endocrinology, 2003. **17**(12): p. 2477-2493.
44. Dimopoulos, N., et al., *The PPAR $\delta$  agonist, GW501516, promotes fatty acid oxidation but has no direct effect on glucose utilisation or insulin sensitivity in rat L6 skeletal muscle cells*. FEBS Letters, 2007. **581**(24): p. 4743-4748.
45. Terada, H., *Uncouplers of oxidative phosphorylation*. Environmental Health Perspectives, 1990. **87**: p. 213-218.
46. Corpeleijn, E., et al., *Oxidation of intramyocellular lipids is dependent on mitochondrial function and the availability of extracellular fatty acids*. American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism, 2010. **299**(1): p. E14-E22.
47. Igal, R.A., P. Wang, and R.A. Coleman, *Triacsin C blocks de novo synthesis of glycerolipids and cholesterol esters but not recycling of fatty acid into phospholipid: Evidence for functionally separate pools of acyl-CoA*. Biochemical Journal, 1997. **324**(2): p. 529-534.
48. Hoeks, J., et al., *Effect of  $\beta$ 1- and  $\beta$ 2-adrenergic stimulation on energy expenditure, substrate oxidation, and UCP3 expression in humans*. American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism, 2003. **285**(4 48-4): p. E775-E782.
49. Bakke, S.S., et al., *Palmitic acid follows a different metabolic pathway than oleic acid in human skeletal muscle cells; Lower lipolysis rate despite an increased level of adipose triglyceride lipase*. Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids, 2012. **1821**(10): p. 1323-1333.
50. Wensaas, A.J., et al., *Cell-based multiwell assays for the detection of substrate accumulation and oxidation*. Journal of Lipid Research, 2007. **48**(4): p. 961-967.
51. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding*. Analytical Biochemistry, 1976. **72**(1-2): p. 248-254.
52. Arya, M., et al., *Basic principles of real-time quantitative PCR*. Expert Review of Molecular Diagnostics, 2005. **5**(2): p. 209-219.
53. Rando, T.A. and H.M. Blau, *Primary mouse myoblast purification, characterization, and transplantation for cell-mediated gene therapy*. Journal of Cell Biology, 1994. **125**(6): p. 1275-1287.



54. Feng, Y.Z., N. Nikolic, S.S. Bakke et al., *PPAR $\delta$  activation in human myotubes increases mitochondrial fatty acid oxidative capacity and reduces glucose utilization by a switch in substrate preference*, 2013: Archives Of Physiology And Biochemistry, under revision.
55. McFie, P.J., et al., *Murine diacylglycerol acyltransferase-2 (DGAT2) can catalyze triacylglycerol synthesis and promote lipid droplet formation independent of its localization to the endoplasmic reticulum*. Journal of Biological Chemistry, 2011. **286**(32): p. 28235-28246.
56. Sugden, M.C. and M.J. Holness, *Recent advances in mechanisms regulating glucose oxidation at the level of the pyruvate dehydrogenase complex by PDKs*. American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism, 2003. **284**(5 47-5): p. E855-E862.

# 6 Vedlegg

## 6.1 Medier til celledyrking

### 6.1.1 Proliferasjonsmedium

500 ml Hams F10 Glutamax nutrient mixture

100 ml Føtal bovint serum (FBS)

2,5 ml penicillin/streptomycin (100 U/ml / 100 µg/ml)

2,5 ml fungizone (250 µg/ml amfotericin)

250 µl (5 ng/ml) Basic fibroblast Growth Factor (BFGF)

### 6.1.2 Hams F-10/DMEM-basert vekstmedium

250 ml Hams F10 Glutamax nutrient mixture

250 ml Dulbecco's Modified Eagle Medium Glutamax (DMEM) (1 g/L glukose)

100 ml Føtal bovint serum (FBS)

2,5 ml penicillin/streptomycin (100 U/ml / 100 µg/ml)

2,5 ml fungizone (250 µg/ml amfotericin)

250 µl (5 ng/ml) Basic fibroblast Growth Factor (BFGF)

### 6.1.3 Fusjonsmedium (differensieringsmedium)

500 ml Dulbecco's Modified Eagle Medium Glutamax (DMEM) (1 g/L glukose)

10 ml hesteserum

2,5 ml penicillin/streptomycin (100 U/ml / 100 µg/ml)

2,5 ml fungizone (250 µg/ml amfotericin)

#### **6.1.4 Frysemedium**

Til 4 cryorør (6 ml frysemedium):

3,2 ml Proliferasjonsmedium eller Hams F-10/DMEM-basert vekstmedium

0,8 ml DMSO

2 ml FBS

## **6.2 0,01 % kollagen I-behandlede celleflasker**

Da kollagen I er svært viskøst og kan være vanskelig å jobbe med i høye konsentrasjoner, brukes kollagen I 100 % og autoklavert vann til å lage en 1 % kollagen I mellomløsning, som deretter benyttes til å lage 0,01 % kollagen I.

- Kollagen I mellomløsning fortynnes i autoklavert vann til 0,01 % sluttkonsentrasjon
- Kollagen I 0,01 % løsning tilsettes NUNC celleflasker slik at det dekker vekstoverflaten (1 ml til 25 cm<sup>2</sup> celleflasker og 2 ml til 75 cm<sup>2</sup> celleflasker)
- Flaskene settes i kjøleskap over natt
- Løsningen fjernes fra flaskene og tas vare på, da den kan gjenbrukes innen to uker
- La flaskene tørke ved romtemperatur uten kork inne i avtrekkskap i noen timer

## **6.3 Andre medier**

### **6.3.1 1x Høstebuffer (PBS)**

8 g NaCl

0,2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

2,9 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O

0,2 g KCl

ad 1 liter dH<sub>2</sub>O

pH justeres til 7,2-7,4 med 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

### **6.3.2 DPBS m/Hepes**

500 ml Dulbecco's Phosphate Buffered Salin (DPBS)

1,19 g Hepes

pH justeres til 7,2 med 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

## **6.4 Akuttmedier til substratoksidasjonsforsøk**

### **6.4.1 [1-<sup>14</sup>C]oljesyre (0,5 µCi/ml, 100 µM)**

Til 80 brønner, 5 ml:

25 µl [1-<sup>14</sup>C]oljesyre (Final: 0,5 µCi/ml, stock: 9 µM, 100 µCi/ml)

5 µl L-karnitin (Final: 1 mM, stock: 1 M)

75,8 µl kald OA (Final: 91 µM, stock: 9 µM, 100 µCi/ml)

15 µl BSA (Final: 7,2 µM, stock: 2,4 mM)

ad 5 ml med DPBS m/Hepes

Til 16 av 80 brønner, 2 ml:

20 µl glukose (Final: 100 µM, stock 10 mM)

\*FCCP tilsettes 32 av 80 brønner

### **6.4.2 D-[<sup>14</sup>C(U)]glukose (0,3 µCi/ml, 100 µM)**

Til 80 brønner, 5 ml:

15 µl D-[<sup>14</sup>C(U)]glukose (Final: 0,3 µCi/ml, stock: 166 µM, 0,5 µCi/ml)

5 µl L-karnitin (Final: 1 mM, stock: 1 M)

ad 5 ml DPBS m/Hepes

\*Til 16 av 80 brønner, 2 ml:

33,3 µl OA (Final: 100 µM, stock: 6 mM)

\*Til resterende 3 ml:

50 µl BSA (Final: 40 µl, stock: 2,4 mM)

\*FCCP tilsettes til 32 av 80 brønner

## 6.5 Medier til substrate proximity assay (SPA)

### 6.5.1 Pulsmedium

Konsentrasjon av [1-<sup>14</sup>C]oljesyre: 0,5 µCi/ml = 8,5 µM

Konsentrasjon OA	Varm OA	Kald OA
50 µM	8,5 µM	41,5 µM
100 µM	8,5 µM	91,5 µM
200 µM	8,5 µM	191,5 µM
400 µM	8,5 µM	391,5 µM
600 µM	8,5 µM	591,5 µM
1000 µM	8,5 µM	991,5 µM

\*Varm og kald OA tilsettes til colorless DMEM fusjonsmedium

### 6.5.2 Colorless DMEM 1 g/l fusjonsmedium

#### 1 liter colorless DMEM medium:

8,3 g DMEM base pulver

950 ml dH<sub>2</sub>O

3,7 g NaHCO<sub>3</sub>

110 mg Natrium pyruvate

20 ml L-glutamin

pH justeres til 7,2-7,3 med H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, før mediet steril filtreres

#### Til 10 ml colorless DMEM medium:

50 µl penicillin/streptomycin (100 U/ml / 100 µg/ml)

50 µl fungizone (250 µg/ml amfotericin)

55 µl glukose 1g/l (stock: 1M)

10 µl Hepes (stock: 1M)

0,2 ml Hesteserum (Final: 2 %)

### 6.5.3 Chasemedium

#### Til 6 ml chasemedium med 0,5 % BSA (1 plate):

30 mg BSA veies ut og løses i DPBS m/Hepes

Tilsett 60 µl glukose (Final: 0,1 mM, stock: 10 mM)

Løsningen fordeles i to rør, 3 ml i hvert rør

Tilsett 3 µl triacsin C i det ene røret (Final: 10 µM, stock: 10 mM)

## 6.6 Live cell imaging

### 6.6.1 PBST-BSA

0,1 % PBST + 2 % BSA:

100 ml PBS

10 µl Tween-20

2 g BSA

## 6.7 Real-time qPCR

### 6.7.1 Primere til real-time qPCR med SYBR Green 1

Gener	Primere
PLIN 2	F: 5'-CAGCCAACGTCCGAGATT G-3' R: 5'-CATGGTAGTCGTCACCACATCCT-3'
β-aktin	F: 5'-AGCCATGTACGTAGCCATCC-3' R: 5'-GCTGTGGTGGTGAAGCTGTA-3'

Gener	Primere
TBP	F: AGCCTTCCACCTTATGCTCAG R: GCCGTAAGGCATCATTGGACT
Plin2	F: GGGCTAGACAGGATGGAGGA R: CACATCCTTCGCCCCAGTTA
Plin3	F: CGAAGCTCAAGCTGCTATGG R: TCACCATCCCATACGTGGAAC
Plin4	F: ACCAACTCACAGATGGCAGG R: AGGCATCTTCACTGCTGGTC
Plin5	F: GGTGAAGACACCACCCTAGC R: CCACCACTCGATTACCACA
Acox1	F: AATCTGGAGATCACGGGCACTT R: GTCTTGGGGTCATATGTGGCAG

Angptl4	F: AAGAGGCTTCCCAAGATGACC R: TTCTTGGAAGAGTTCCTGGCA
PPAR $\delta$	F: ACATGGAATGTGGGTGTGC R: CGAGCTTCATGCGGATTGTC
PPAR $\alpha$	F: ACTACGGAGTTCACGCATGT R: GTCGTACACCAGCTTCAGCC
Cpt1b	F: CCCTCATGGTGAACAGCAACT R: GCATTGCCTAGACGGGCTG
CD36	F: AGGCATTCTCATGCCAGTCG R: TGTACACAGTGGTGCCTGTT
DGAT1	F: CCATACCCGGGACAAAGACG R: GAATCTTGCAGACGATGGCAC
DGAT2	F: GGCTACGTTGGCTGGTAACT R: ATGGTGTCTCGGTTGACAGG
Cyc1	F: GGCTCCTCCCATCTACACAGAA R: GTGGCGACATCCTTAGCTACTT
Acot1	F: TGGAGTACTTTGAAGAAGCCGT R: CAAGCAGCCCAATTCCAGGT
Pgc1 $\alpha$	F: AGTCCCATACACAACCGCAG R: CCCTTGGGGTCATTTGGTGA
Pgc1 $\beta$	F: ACGTGGACGAGCTTTCACTG R: TTCAGAGCGTCAGAGCTTGC
PDK4	F: AAGATGCTCTGCGACCAAGTA R: CAATGTGGATTGGTTGGCCTG

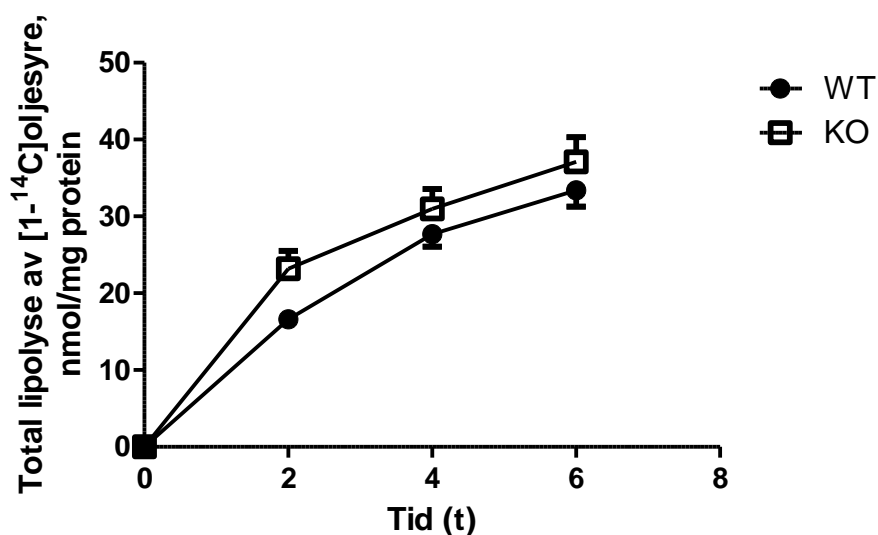
### 6.7.2 TaqMan<sup>®</sup> Gene expression assay

Assay	Nummer	Gen navn	Assay ID
TBP	m-60	TBP	Mm00446973_m1
Plin2	m-8	Plin2	Mm00475794_m1
Plin2	m-77	Plin2	Mm00475796_m1
Acox1	m-96	Acox1	Mm01246831_m1
Angptl4	m-95	Angptl4	Mm00480431_m1
PPAR $\delta$	m-49	PPAR $\delta$	Mm01305434_m1
PPAR $\alpha$	m-48	PPAR $\alpha$	Mm00440939_m1
Cpt1b	m-99	Cpt1b	Mm00487200_m1



## 6.8 Lipolyse ved tilnærmet lik mengde OA akkumulert

Donor	Konsentrasjon av oljesyre ved tid 0 (nmol/mg)	Lipolyse (gjennomsnitt $\pm$ SEM)(nmol/mg)	[1- <sup>14</sup> C]oljesyre konsentrasjon ( $\mu$ M)
KO 5	104,1	30,56 $\pm$ 2,7	1000
KO 5	97,71	30,28 $\pm$ 2,2	1000
WT 1	111,38	26,34 $\pm$ 1,6	400
WT 2	107,6	25,43 $\pm$ 2,2	100



**Figur 40: Total lipolyse av [1-<sup>14</sup>C]oljesyre i nmol/mg ved ulike oljesyrekonsentrasjoner.** Total lipolyse av [1-<sup>14</sup>C]oljesyre i nmol/mg av *PLIN2-WT1* myotuber inkubert med 400  $\mu$ M OA, *PLIN2-WT2* myotuber inkubert med 100  $\mu$ M OA og *PLIN2-KO* myotuber inkubert med 1000  $\mu$ M OA over 6 timer. Data er presentert som gjennomsnitt  $\pm$  SEM av 8 paralleller for hvert forsøk, n=1 for hver donor.